

# Biologia Celular e Molecular I

- Capítulo I: Princípios de organização e função celular

## Perspectiva histórica sobre o conceito de célula:

- Em 1665, Hooke observa cortiça ao microscópio chamando aos espaços visíveis células;
- Em 1674-1687 Antoine Van Leeuwenhoek descreve animalúnculos;
- No ano de 1838 Matthias Schleiden diz que as células representam a unidade estrutural e funcional de todos os seres vivos, ou seja, cada célula possui uma organização molecular que lhe permite desempenhar as funções que caracterizam a vida. Sendo que um ano mais tarde, em 1839, Theodor Schwan defende essa mesma teoria;
- Em 1858 Rudolf Virchow diz que cada animal representa o somatório de unidades vitais, cada uma das quais reúne por completo todas as propriedades da vida – “omnis cellula a cellula.” – Teoria Celular;
- A Teoria Celular é aceite nos finais do século XIX quando Pasteur prova que não existe geração espontânea.

## Caracterização geral de células procariotas e eucariotas:

As células vivas classificam-se em procariotas e eucariotas

### ❖ Células Procariotas:

- Representadas essencialmente pelas bactérias;
- Correspondem aos descendentes mais directos das primeiras formas de vida há cerca de 3.5 biliões de anos;
- Têm pequenas dimensões;
- Apresentam grande variedade morfológica e organização celular simples;

- Não possuem núcleo, mas sim nucleóide (área ocupada pelo material genético);
- Possuem ribossomas específicos;
- Podem possuir, ou não, outras estruturas como flagelos, fímbrias, cápsula, inclusões citoplasmáticas, estruturas membranosas intracitoplasmáticas, vesículas gasosas e endosporos;
- Em geral, os procariotas reproduzem por fissão binárias, gemulação, fragmentação, produção de esporos em esporângios, fissão múltipla, entre outros processos de reprodução assexuada;
- As células procariotas não possuem membranas a definir compartimentos individualizados, sendo que as principais funções são desempenhadas pela membrana citoplasmática;
- As células procariotas dividem-se em dois principais grupos, Bactéria e Archaea.
- A parede celular das células procariotas é, geralmente, uma camada rígida, que envolve a membrana celular. Constitui o principal suporte mecânico da célula, confere-lhe estabilidade e actua como barreira física. Relativamente à estrutura e composição química da parede celular existem diferenças entre as bactérias e as arqueas.

#### Parede celular das bactérias:

-Quase todas as bactérias apresentam nas suas paredes celulares um polímero rígido, insolúvel em água e quimicamente complexo, designado peptidoglicano ou mureína. Este componente da parede bacteriana, responsável pela sua rigidez e morfologia, nunca ocorre nas paredes das arqueas.

-O peptidoglicano ou mureína é um heteropolímero constituído por cadeias lineares de dois aminoaçúcares, o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina, dispostos alternadamente e unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4).

-É possível classificar as bactérias em dois grupos distintos, em função da constituição das suas paredes celulares, utilizando uma técnica designada coloração de Graam – desenvolvida em 1884 por Christian Graam.

-O que se verifica é que as bactérias consideradas Graam (-), possuem uma parede celular mais complexa e estratificada, sendo uma das camadas constituída por uma fileira de peptidoglicanos pouco espessa e a outra, designada membrana exterior, constituída por lipopolissacarídeos, proteínas e fosfolípidos. É esta membrana exterior a “chave” do processo de diferenciação. Relativamente às bactérias consideradas Graam (+), verifica-se que estas possuem uma espessa camada de peptidoglicanos, contudo não são formadas pelos ditos lipopolissacarídeos, proteínas e fosfolípidos.

Parede celular das arquea:

-A parede celular das arquea não contem peptidoglicanos, mas um polímero semelhante designado pseudopeptidoglicano pode estar presente em algumas arquea, enquanto que noutras a parede celular é de natureza proteica ou glicoproteica.

-o pseudopeptidoglicano é formado por N-acetilglucosamina e ácido N-acetiltalosaminurónico (em vez de ácido N-acetilmurâmico), os dois açúcares são unidos por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-3) em vez de  $\beta$  (1-4) e as cadeia peptídicas ligadas ao ácido N-acetiltalosaminurónico contêm L-aminoácidos.

Formas predominantes de células procariotas:

1) Cocos – forma esférica

- Diplococos (pares de cocos)
- Tétradas (associações de quatro cocos)
- Estreptococos (associação de cocos em cadeia)
- Estafilococos (grupos irregulares de cocos)
- Sarcina (grupos cubóides de cocos)

2) Bacilos – forma cilíndrica ou em bastonete

3) Espirilos – forma helicoidal rígida

4) Espiroquetas – forma helicoidal flexível

❖ Células Eucariotas:

- Dividem-se em dois grandes grupos: células animais e células vegetais;
- Possuem membranas internas que envolvem compartimentos específicos, os organelos;
- Presume-se que existam na Terra há cerca de 1.5 biliões de anos;
- Apresentam núcleo, o qual encerra o material genético;
- Além do núcleo possuem, na generalidade, muitos outros organelos como as mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, vesículas de Golgi; peroxissomas, lisossomas, cloroplastos, entre outros;



### Noção de Vírus:

- Vírus são pequenos parasitas acelulares que não possuem capacidade de reprodução própria, nem metabolismo independente não sendo, portanto, considerados um organismo vivo;
- São parasitas celulares obrigatórios formados por uma molécula de DNA ou RNA envolvida por uma camada proteica, a cápside, que por vezes possui enzimas;
- Muitos vírus possuem um invólucro externo semelhante à membrana plasmática das células;
- Os vírus não têm mecanismos de reparação do material genético e, por isso, a taxa de mutação é elevada;
- São apenas visíveis ao microscópio electrónico.

### Reprodução de um vírus:

- 1) O vírus liga-se a receptores específicos da membrana da célula hospedeira;
- 2) A parte interna do vírus entra para o interior da célula;
- 3) As proteínas virais são degradadas;
- 4) O material genético (DNA ou RNA) viral replica-se e é transcrito, sendo produzidas as proteínas virais;
- 5) As proteínas virais formam a nova cápsula que envolve o material genético;
- 6) O novo vírus abandona a célula e espalha-se no organismo e infecta outras células.

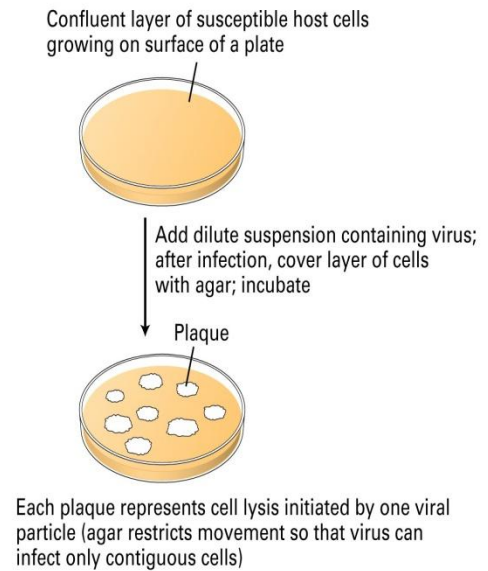
### As infecções virais podem ser líticas ou não líticas:

- A infecção viral lítica requer absorção, penetração, síntese de proteínas virais e do genoma de replicação, montagem dos vírus de replicação e libertação de centenas a milhares de vírus, acarretando a morte das células hospedeira. A libertação de vírus revestidos ocorre pela abertura da membrana citoplasmática da célula hospedeira
- As infecções não-líticas ocorrem quando o genoma viral é integrado no DNA da célula hospedeira e geralmente não leva a morte celular

## Clonagem e contagem de vírus:

-O número de partículas virais infecciosas numa amostra pode ser quantificado por um teste de plaqueamento. Esse teste é realizado pela cultura de uma amostra diluída de células virais sobre uma placa coberta com células hospedeiras, sendo em seguida contado o número ocorrente de lesões locais, chamadas *placas*. A placa forma-se na caixa de Petri sempre que um vírus isolado infecta uma célula isolada. O vírus replica-se nessa célula hospedeira inicial e em seguida lisa a célula, libertando muitos novos vírus, que, por sua vez, infectam as células vizinhas da caixa de petri. Depois de alguns desses ciclos de infecção, células suficientes foram lisadas para produzir uma placa visível na camada de células não infectadas remanescentes.

Tendo em conta que os vírus na placa são derivados de um mesmo vírus parental, eles constituem um clone viral.

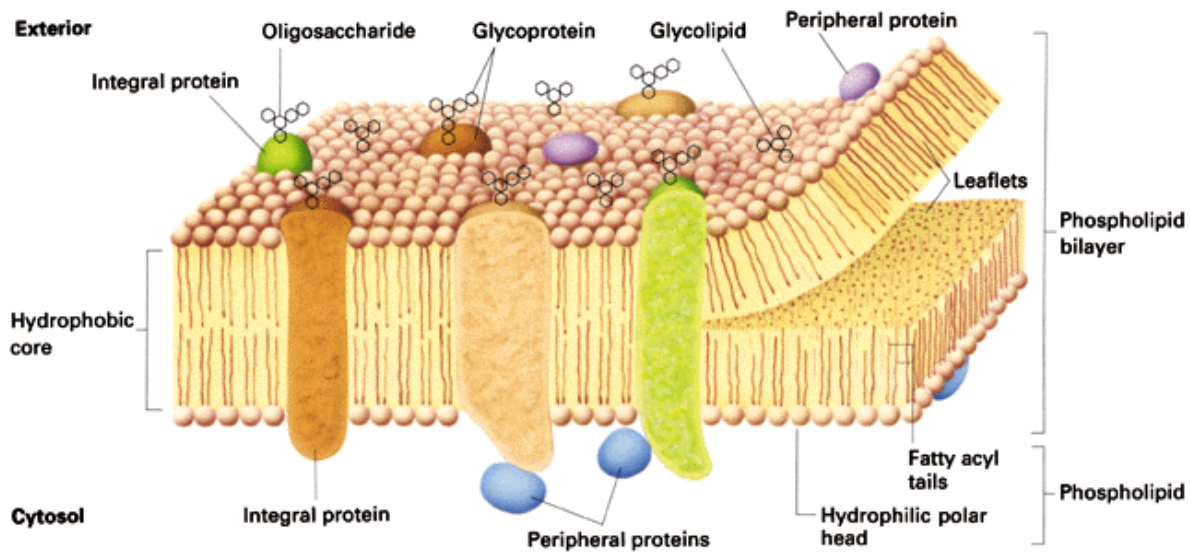


## Membranas Biológicas:

- As membranas biológicas são bicamadas de lípidos anfipáticos, os fosfolípidos, que fazem com que a membrana seja impermeável à água e a moléculas solúveis em meio aquoso, onde se intercalam proteínas que podem ser integrais, quando atravessam todo o plano hidrofóbico da bicamada ou periféricas, quando se encontram associadas a apenas um dos folhetos da bicamada;
- São estruturas termodinamicamente estáveis, cuja manutenção não requer hidrólise de ATP;
- Permitem a separação do conteúdo celular do espaço extracelular;
- Fluidez e assimetria são duas características presentes em todas as membranas biológicas.

A fluidez traduz-se pelo marcado movimento lateral a que os fosfolípidos e proteínas estão sujeitos ao longo do plano de cada um dos dois folhetos da bicamada.

A assimetria expressa-se pela diferente composição molecular observada nas duas metades da membrana, isto é, os fosfolípidos e as proteínas não se encontram distribuídos de forma equivalente nos dois folhetos da membrana, estando os glicolípidos presentes apenas no folheto exoplasmático da bicamada fosfolipídica.



#### ❖ Lípidos da membrana:

- Fosfolípidos
  - Os fosfolípidos são as moléculas lipídicas mais abundantes nas membranas biológicas;
  - São moléculas anfipáticas e, portanto, são constituídas por duas extremidades que reagem de forma diferente à presença de água: uma cabeça polar hidrofílica e duas caudas apolares hidrofóbicas de ácidos gordos.
  - Na presença de água, os fosfolípidos anfipáticos orientam-se de modo a evitarem o contacto das suas extremidades hidrofóbicas com as moléculas de água. Por esta razão organizam-se espontaneamente em pequenas formações esféricas – as micelas – ou, tal como é observado nas membranas biológicas, em bicamadas, com as extremidades hidrofóbicas dos fosfolípidos orientadas face a face, e para o interior da membrana.
  - Existem quatro tipos de fosfolípidos principais: fosfatidilcolina; esfingomielina; fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. O único destes fosfolípidos que apresenta carga negativa é a fosfatidilserina, os outros três fosfolípidos são neutros a pH fisiológico.
  - O arranjo geométrico da extremidade hidrofóbica dos fosfolípidos, nomeadamente aquele que deriva do grau de saturação dos ácidos gordos, condiciona a sua fluidez, tal como altera a temperatura a que é preciso descer para induzir a transição da fase líquida à fase cristalina da membrana. É por esta razão que os fosfolípidos

saturados apresentam uma difusão lateral menos rápida na membrana e atingem uma transição de fase a temperaturas menos baixas que os fosfolípidos insaturados.

- Colesterol
  - O colesterol é, a seguir aos fosfolípidos, a molécula lipídica mais abundante nas membranas biológicas.
  - É essencial para que não ocorram roturas na bicamada fosfolipídica.
  - São moléculas que têm maior facilidade em saltar entre os dois folhetos da membrana (movimento de flip-flop) do que os fosfolípidos.
  - Reforça a impermeabilidade da bicamada à água, diminui a fluidez da membrana e também a temperatura a que se regista a transição de fase.
  - As membranas procariotas são totalmente desprovidas de moléculas de colesterol.
- Esfingolípidos
  - Os esfingolípidos possuem um grupo polar e duas caudas apolares, não possuindo glicerol, ao contrário dos glicerofosfolípidos.
  - São constituídos por uma molécula de esfingosina-amino-alcool de cadeia longa ou um seu derivado e por uma molécula de ácido gordo de cadeia longa e um grupo polar - que é ligado por uma ligação glicosídica ou por um fosfodiéster.
- Glicolípidos
  - Uma pequena percentagem dos lípidos da membrana contém oligossacarídeos, deste modo recebem a designação de glicolípidos.
  - Os glicolípidos estão distribuídos com total assimetria na membrana
  - Encontram-se apenas no folheto exoplasmático da membrana exterior das células eucarióticas.
  - Os glicolípidos não têm a capacidade de executarem movimentos de flip-flop entre os dois folhetos da membrana.
  - Os glicolípidos podem actuar como receptores específicos de moléculas presentes fora da célula, podendo também ligar-se a componentes da matriz intercelular.



### Mobilidade e assimetria das membranas biológicas:

- Os lípidos apresentam movimentos a nível da membrana biológica, sendo que esses movimentos são tanto de rotação sobre si próprios, quando de lateralidade no plano da membrana.
- O movimento lateral dos lípidos faz-se dentro de cada um dos dois folhetos da bicamada, sendo raras as permutas destas moléculas entre os dois folhetos (flip-flop) devido à barreira hidrofóbica que os separa, o que requer acção enzimática e consumo de energia.
- A desigual composição química dos fosfolípidos da bicamada implica a natureza assimétrica da membrana. Os dois folhetos apresentam também diferenças de carga eléctrica, sendo que o folheto citoplasmático apresenta maior carga negativa.
- A assimetria não é regra universal para todas as moléculas da membrana, dado que as moléculas de colesterol se encontram, geralmente, em número semelhante nos dois folhetos da membrana.

#### ❖ Proteínas da membrana:

- A massa de uma proteína de membrana de tamanho médio é 40 a 60 vezes superior à massa de um fosfolípido.
- Grande parte das proteínas da membrana, contêm resíduos sacarídeo e são, portanto, glicoproteínas.
- Tal como acontece com as moléculas lipídicas da membrana, as proteínas estão sujeitas a movimentos de rotação e lateralidade e, tal como acontece com os glicolípidos, não lhes é permitido movimentos de flip-flop entre os dois folhetos da bicamada.
- A maior parte das funções específicas da membrana é desempenhada pelas proteínas, nomeadamente a formação de canais para a passagem de água e o transporte activo de iões e pequenas moléculas, a expressão de receptores envolvidos na activação celular ou em fenómenos de endocitose, a ancoragem da membrana a elementos do citoesqueleto, etc.

### Descrição morfológica e funcional dos vários orgânitos de uma célula eucariótica:

❖ Núcleo:

- É o maior organelo nas células eucariotas;
- Delimitado do citoplasma pelo invólucro nuclear;
- Apresenta uma forma aproximada de esfera com 10 micrometros de diâmetro;
- Encerra o património genético da célula, sob a forma de molécula de DNA;
- Funciona como centro de controlo da célula e como local onde decorrem a armazenagem e replicação do DNA;
- Circundado por duas membranas. A membrana nuclear interna define o próprio núcleo. Em muitas células, a membrana nuclear externa tem continuidade com o retículo endoplasmático rugoso, e o espaço definido entre estas membranas tem continuidade com o lúmen do retículo endoplasmático rugoso.
- As duas membranas nucleares parecem fundir-se nos poros nucleares. Os poros funcionam como canais que regulam o movimento de material entre o núcleo e o citosol.
- Em células metabolicamente activas é frequente observar um ou mais nucléolos, locais onde se formam os ribossomas, a partir de proteínas específicas e RNA. Os nucléolos não estão isolados por membranas do resto do núcleo.
- O interior do compartimento nuclear - nucleoplasma - é uma solução aquosa em tudo semelhante ao citosol, que contém uma rede de filamentos associados ao invólucro nuclear.

❖ Retículo Endoplasmático:

- Constitui uma parte do extenso sistema endomembranar que compõe a maioria do citoplasma de uma célula eucariótica. Em certas locais é contínuo com o invólucro nuclear. O retículo pode ser funcional e estruturalmente dividido em retículo endoplasmático rugoso e retículo endoplasmático liso;
- O retículo rugoso deve o seu nome ao facto de as suas membranas conterem ribossomas, locais de síntese proteica. As proteínas são lançadas para o interior das membranas, onde são transformadas ou dirigidas a outras localizações da célula.
- O retículo liso não apresenta ribossomas nas suas membranas e nele as proteínas sintetizadas no retículo rugoso são quimicamente alteradas. Ocorrem ainda no seu lúmen a hidrólise do glicogénio, síntese de esteróides e alteração de drogas e outras substâncias nocivas ao organismo.

❖ Complexo de Golgi:

- Deve o seu nome ao cientista italiano que primeiro o observou ao microscópio óptico composto. É formado por sáculos membranosos achatados designados cisternas e pequenas vesículas.
- O aparelho de Golgi recebe do retículo endoplasmático rugoso, proteínas transportadas em vesículas membranosas. Essas moléculas são então separadas e modificadas quimicamente, sendo depois encaminhadas para as suas localizações definitivas. Destinam-se ao exterior da célula e são "embaladas" em vesículas que se irão fundir com a membrana plasmática e libertadas para o exterior. Destinam-se também ao citoplasma, as vesículas irão fundir-se com outros organitos.
- As vesículas formadas pelo R.E.R. são recebidas pela face *cis*, ou de recepção, do Golgi, as proteínas alteradas no lúmen das cisternas e libertadas pela face *trans*, ou de formação, virada para a membrana plasmática. ~

#### ❖ Mitocôndria:

- É o organito responsável pela transformação da energia contida nos alimentos em energia metabólica (ATP). Estas transformações designam-se, no seu conjunto, respiração celular.
- As mitocôndrias têm duas membranas, como o núcleo ou os cloroplastos. A membrana externa é lisa e fornece protecção, embora seja bastante permeável à passagem de substâncias. A membrana interna contém grandes complexos proteicos envolvidos na síntese de ATP e na respiração celular. Esta membrana está dobrada em pregas achatadas designadas cristas, que aumentam grandemente a sua área. O número de cristas varia muito com a taxa metabólica da célula em que a mitocôndria se encontra.
- A matriz é a região interna da mitocôndria, rodeada pela membrana interna. Contém numerosas proteínas envolvidas nos processos respiratórios, bem como ribossomas e DNA, usados na síntese da maioria das suas proteínas.

#### ❖ Peroxisoma:

- É um organito relativamente pouco conhecido, no qual produtos tóxicos para a célula, como peróxido de hidrogénio, são degradados em produtos inofensivos, como água e oxigénio.

Exclusivamente em células vegetais existem organitos semelhantes, designados glioxissomas.

❖ Centrossoma:

- É uma região mais ou menos amorfa, localizada perto do envelope nuclear em células animais. Ao centro desta zona está um par de estruturas cilíndricas designadas centríolos e dispostas em ângulo recto, como um L.

❖ Centríolos:

- Estão intimamente relacionados com o movimento celular, seja por meio de flagelos ou de cílios, em cuja base existe sempre um corpo basal, em tudo semelhante ao centríolo típico. Esta relação é confirmada pelo facto de muitas vezes os flagelos ou cílios serem reabsorvidos e os seus corpos basais deslocados para o interior da célula, passando a funcionar como centríolos.
- A estrutura do centríolo é formada por nove grupos de três microtúbulos fundidos. Estes nove conjuntos formam a "parede" da estrutura, ligeiramente rodados para o interior, como hélices de uma turbina. Cada conjunto está ligado longitudinalmente ao adjacente por outro tipo de proteínas.

❖ Plastídeos:

- Característicos das células vegetais e têm uma estrutura própria: são envolvidos por um envelope com duas membranas, a mais interna das quais se diferencia num sistema complexo, e que rodeia uma matriz mais ou menos homogénea, o estroma. Os plastídeos são geralmente classificados segundo o tipo de pigmentos que contêm.
- Os cloroplastos são plastídeos que apenas existem em células autotróficas, ditas vegetais. As células animais, heterotróficas, não produzem cloroplastos mas podem apresentá-los, perfeitamente funcionais, retirados da digestão parcial de células vegetais ou devido a algas verdes que vivem em simbiose nesses tecidos. Esta situação é bastante comum em corais e anêmonas. É o local onde se realiza a fotossíntese, pelo que contém grande quantidade de pigmentos,

nomeadamente clorofilas. Geralmente localizam-se nos lados longos das células, perto da parede celular. A sua estrutura faz lembrar a da mitocôndria, pois também apresenta duas membranas. A membrana externa é bastante permeável, permitindo a passagem da maioria das pequenas moléculas. A membrana interna é bem mais selectiva e é onde se localizam os complexos que captam a luz para as reacções fotossintéticas. Forma dobras designadas tilacóides. Quando os tilacóides aparecem empilhados como moedas designam-se grana. O espaço interno do cloroplasto designa-se estroma e é rodeado pela membrana interna. Neste espaço, tal como na mitocôndria, encontra-se DNA e ribossomas, capazes de comandar numerosas proteínas presentes no cloroplasto. No entanto, o controlo é nitidamente do núcleo, sendo a maior parte do material sintetizado com DNA nuclear e transferido para o plastídeo. Em algas verdes e plantas é frequente encontrar no estroma grãos de amido e/ou pequenas gotas de lípidos. Estes são produtos de armazenamento temporário, quando o organismo fotossintetiza activamente.

- Os cromoplastos são plastídeos de tamanhos muito diversos que armazenam outro tipo de pigmentos (que não clorofila), principalmente carotenóides. São responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha de folhas velhas, flores e frutos maduros. Podem desenvolver-se a partir de cloroplastos em que a clorofila e as membranas internas se desintegram e grandes quantidades de carotenóides são armazenados. A sua função na planta não é bem reconhecida, embora sejam fundamentais na atracção de insectos e vertebrados.
- Os leucoplastos são plastídeos não pigmentados. Alguns sintetizam amido - amiloplastos - outros prótidos e mesmo lípidos. Quando expostos á luz transformam-se em cloroplastos.

#### Caracterização de imagens obtidas em microscópio:

O microscópio é o instrumento básico para o estudo da célula. A invenção do microscópio é atribuída a Antoine Leeuwenhoek e Robert Hooke no séc. XVII. Já no século XIX, Schleiden e Schwann, com base nas observações microscópicas até aí efectuadas, elaboram a teoria segundo a qual todos os seres vivos são constituídos por células. Desde aí as técnicas e metodologias para observar as células e a sua estrutura têm evoluído continuamente. As técnicas citoquímicas vieram possibilitar a identificação e localização de diversas moléculas constituintes das células e o desenvolvimento dos microscópios electrónicos possibilitou avanços extraordinários acerca da sua ultra-estrutura. Simultaneamente ao desenvolvimento do microscópio electrónico, foram desenvolvidas outras técnicas analíticas que permitem isolar organelos celulares e efectuar o estudo in vitro de suas moléculas e funções.

Os microscópios pertencem a duas categorias, dependendo do princípio em que se baseia a ampliação: luminoso ou óptico (utiliza radiação constituída por fotões) e electrónico (utiliza um feixe de electrões).

❖ Comparação entre os dois tipos de microscópios, óptico e electrónico:

Característica	Microscópio óptico	Microscópio electrónico de transmissão
Ampliação	25 a 1500 x	1 500 a 200 000 x
Limite de resolução	0,2 $\mu\text{m}$	0,4 a 0,5 $\eta\text{m}$ na prática 1 $\eta\text{m}$ (10 Å)
Tipo de radiação	Feixe de fotões	Feixe de electrões
Comprimento de onda da radiação	0,4 a 0,7 $\mu\text{m}$ (+/- 0,55 $\mu\text{m}$ )	0,05 Å
Tipo de lentes	Ópticas	Electromagnéticas
Visualização da amostra	Visualização directa	Em écran fluorescente
Espessura dos cortes	5 a 10 $\mu\text{m}$	0,02 a 0,1 $\mu\text{m}$ (20 a 100 $\eta\text{m}$ )
Coluna	Coluna em vácuo	

❖ Comparação entre diferentes tipos de microscopia

Tipo de microscopia	Ampliação total	Aspecto do objecto	Exemplos de aplicações
Campo luminoso	1000 – 2000 x	Objectos corados ou não; as bactérias, geralmente coradas, assumem a cor do corante	Determinação dos elementos morfológicos grosseiros de bactérias, leveduras, fungos, algas, protozoários
Campo escuro	1000 – 2000 x	Geralmente não corados; o objecto aparece brilhante ou “iluminado” sobre um fundo escuro	Microorganismos que exibem algum dado morfológico característico em estado vivo e em suspensão líquido (ex. espiroquetas)
Ultravioleta	1000 – 2000 x	Não é possível a visualização directa; fotografado	Diferenciação de componentes celulares, com base em maior ou menor absorção da luz ultravioleta
Fluorescente	1000 – 2000 x	Brilhante e corado; cor do corante fluorescente	Técnicas de diagnóstico, nas quais o fluorocromo fixado ao organismo revela a sua identidade
Contraste de fase	1000 – 2000 x	Vários graus de “brilho”	Exame de estruturas celulares em células vivas de microorganismos como leveduras, algas, protozoários e algumas bactérias
Electrónica (TEM)	200 000–400 000 x	Observação em écran fluorescente	Exame de vírus e da ultra-estrutura celular

- Capítulo II: Genética Molecular - Mecanismos e expressão Genética

- ❖ Gene – É a unidade fundamental física e funcional da hereditariedade, constituindo todo o segmento da molécula de DNA que contém informação para a síntese de proteínas. Segmentos de DNA com um determinado número de nucleótidos e com uma ordem própria constituem uma unidade de linguagem química designada por gene. O gene é um segmento de um cromossoma a que corresponde um código distinto, uma informação específica para produzir uma determinada proteína ou controlar uma característica, por exemplo, a cor dos olhos.
- ❖ Cromossoma – É uma molécula de DNA, extremamente longa e associada a proteínas. Contém vários genes que são responsáveis por diferentes características.
- ❖ Cromatina - A cromatina existe nas formas distendida e condensada.

A aparência da cromatina extraída dos núcleos e examinada a microscópio electrónico depende da concentração de sal a qual está exposta. Em baixas concentrações e na ausência de cationes covalentes como  $Mg^{+2}$ , a cromatina isolada assemelha-se a um colar de contas. Nessa forma distendida, o cordão é composto por DNA livre, chamado DNA de ligação (*linker*), que se une as estruturas em forma de contas, chamadas nucleossomos. Os nucleossomos, compostos de DNA e histomas ao redor do qual o segmento de 147pb de DNA é enrolado, têm um diâmetro de aproximadamente 10nm e são as unidades estruturais primárias das cromatinas. Se a cromatina for isolada em concentrações salinas fisiológicas, assumirá a forma mais condensada como uma fibra, de 30 nm de diâmetro.

A cromatina das regiões transicionalmente inactivas do DNA das células parece estar em uma forma condensada de fibras, as quais formam estruturas altamente condensadas.

A cromatina das regiões de DNA com transcrição activa nas células parece estar numa forma aberta, distendida.

A acetilação e desacetilação reversível dos resíduos de lisina da extremidade N-terminal das histomas H2A, H2B, H3 e H4 controlam a força de ligação entre o DNA e octâmero de histonas e afectam o arranjo dos nucleossomos na forma condensada da cromatina.

As caudas das histonas também podem ser modificadas por metilação, fosforilação e monoubiquitanação. Essas modificações influenciam a estrutura da cromatina pela regulação da ligação das caudas das histonas às outras proteínas associadas à cromatina menos abundante.



A cromatina hipoacetilada e transicionalmente inactiva assume uma forma mais condensada e é mais resistente à DNase I do que a forma hiperacetilada e transicionalmente activa da cromatina.

Cada cromossoma eucariótico contém uma única molécula de DNA compactada nos nucleossomos e arranjada na fibra de cromatina de 30nm, a qual está fixada a uma proteína de suporte em sítios específicos. O dobramento adicional do suporte compacto ainda mais a estrutura na forma altamente condensada apresentada pelos cromossomas em metáfase.

- Cromossomas

Em eucariotas, a unidade estrutural do material genético, consistindo de uma única molécula linear de DNA dupla fita e proteínas associadas. Na maioria dos procariotas, uma única molécula circular de DNA dupla fita constitui quase totalidade do material genético.

Durante a metáfase, os cromossomas eucarióticos tornam-se tão condensados que podem ser observados individualmente ao microscópio óptico.

O cariótipo, o conjunto de cromossomas em metáfase, é característico de cada espécie. Espécies altamente relacionadas podem exibir cariótipos muito diferentes, indicando que a informação genética similar pode ser organizada nos cromossomas de várias maneiras.

A análise de bandeamento e a pintura de cromossomas, um método mais preciso, é utilizado por identificar os diferentes cromossomas humanos em metáfase e para detectar translocações e deleções.

O padrão de bandas altamente reprodutível dos cromossomas politênicos permitiu a localização do DNA da *Drosophila* por hibridização *in situ* e a visualização de deleções cromossómicas e rearranjos que provocam alterações no padrão normal de bandas.

Quando os cromossomas em metáfase sofrem descondensação, durante a interfase, certas regiões, denominadas heterocromatina, permanecem muito mais condensadas que a maior parte da cromatina, chamada eucromatina.

Três tipos de sequências de DNA são necessárias para que uma longa molécula de DNA linear actue como um cromossoma: uma origem de replicação, chamada ARS em leveduras; uma sequência de centrómero (CEN); e duas sequências teloméricas (TEL) nas extremidades do DNA.

Fragmentos de DNA de até 106 pares podem ser clonados em vectores de cromossoma artificial de levedura (YAC)

- Cromossomas homólogos: uma de duas células de cada tipo morfológico do cromossoma presente em uma das células diplóide; também chamado homólogo. Cada homólogo é derivado de um dos progenitores.

- Cromossoma politénico: cromossoma dilatado composto por muitas cópias paralelas dele próprio, formado por ciclos múltiplos de replicação do DNA, sem separação cromossomal. Os cromossomas politénos, os quais têm padrões de bandas altamente reprodutíveis são encontrados nas glândulas salivares e alguns outros tecidos.

#### Mecanismo molecular de transcrição em células procarióticas:

Nas células procariotas, a transcrição dos RNA celulares, quer sejam ribossomais, mensageiros, de transferência ou outros, processa-se sob catálise de uma única RNA polimerase bacteriana. A RNA polimerase bacteriana apresenta uma estrutura oligomérica, em que cada uma das subunidades constituintes confere propriedades bioquímicas específicas, inerentes à sua complexidade e função. A transcrição nos procariontes ocorre ao nível do citoplasma, simultaneamente à tradução e compreende três etapas, iniciação, elongação e terminação.

!!!!FALTA ESPECIFICAR CADA UMA DAS ETAPAS!!!!

#### Regulação da expressão genética:

Se a expressão dos genes não fosse regulada por mecanismos específicos, a célula produziria constantemente proteínas em elevadas quantidades. Mas nem todas as proteínas são necessárias em determinadas circunstâncias e nas mesmas quantidades.

#### Regulação ao nível da Transcrição:

Um gene não possui apenas na sua sequência bases que serão transcritas para RNA; possui sequências associadas à sua regulação e à ligação com a RNA polimerase:

- Promotor: região do DNA à qual se liga uma RNA polimerase para dar início à transcrição.
  - Procariontes: o promotor tem a designação de Pribow-box.
  - Eucariontes: os promotores existem em maior número e a maiores distâncias. Estas sequências permitem a ligação de determinadas proteínas que auxiliam a ligação da RNA polimerase.

- Indutor: proteína que induz a transcrição, mediando a ligação da RNA polimerase ao DNA.
  - Repressor: proteína que se pode ligar ao DNA, impedindo que a RNA polimerase avance, actuando como mecanismo de controlo da transcrição, ao regular a produção de RNAm de acordo com as necessidades.
- Ao impedir a síntese de novo RNAm pelo mecanismo da transcrição, a célula consegue regular a produção de proteínas, pois os RNAm que tinha produzido anteriormente apresentam um período de vida curto, degradando-se em cerca de dois minutos. Um ciclo de degradação e nova síntese de RNAm nas células ocorre rápida e continuamente, o que constitui um requisito fundamental para o controlo da transcrição e um procedimento fulcral na regulação da expressão génica em procariontes.

#### Regulação ao nível da estrutura da cromatina:

- Heterocromatina: zonas onde a cromatina se encontra altamente condensada e onde os genes não são transcritos (encontram-se silenciados).
- Eucromatina: regiões com menor grau de condensação que, como se encontram menos enroladas, permitem a ligação da RNA polimerase ao DNA, possibilitando a ocorrência da transcrição.
- O grau de condensação da cromatina permite, assim, controlar a expressão de um grande conjunto de genes, facilitando ou impedindo o contacto entre a enzima e o DNA.

#### Regulação ao nível do processamento, tradução do RNAm e pós-tradução:

- O processamento de RNA inclui, nos eucariontes, o processo de excisão, em que determinados fragmentos de RNA são removidos, não sendo assim traduzidos em proteínas. Ao nível deste processo pode ocorrer regulação na selecção dos fragmentos a remover: um mesmo gene, ao ser transcrito em dois órgãos distintos origina RNAm iguais; todavia, este pode sofrer mecanismos de excisão diferentes, originando RNAm maduros igualmente diferentes. Consequentemente, nos dois órgãos podem formar-se duas proteínas com funções diferentes, codificadas por um mesmo gene.
- A célula consegue controlar o tempo de duração de uma molécula de RNAm, manuseando a produção de proteínas. Se uma molécula de RNAm tiver um tempo de vida longo, poderá ser repetidamente lida pelos ribossomas, sendo assim traduzida em muitas moléculas de proteínas iguais entre si. Se tiver, pelo contrário, um tempo curto de vida, poucas proteínas se formarão a partir desse RNA. O tempo de vida pode ser modificado por complexos proteicos que se ligam e protegem o RNAm da degradação por enzimas presentes no citoplasma.

- Tradução: a manipulação das proteínas específicas que permitem a ligação dos ribossomas ao RNAm permite à célula adequar a tradução, controlando a quantidade de proteínas que se formam por leitura do RNAm.

#### Regulação nos Procariontes:

- Expressão constitutiva: quando as proteínas são permanentemente necessárias e os respectivos genes são permanentemente transcritos.
- Expressão induzida: as proteínas são apenas necessárias quando a bactéria se encontra a crescer em condições especiais.
- Pelo facto de se tratar de células mais simples, a regulação ocorrerá essencialmente ao nível da transcrição, em detrimento da tradução. O processamento de RNAm não ocorre nas células procarióticas, pois o RNAm, logo após a transcrição, é imediatamente traduzido pelos ribossomas.
- Os genes bacterianos possuem também sequências reguladoras, localizadas na sua proximidade. Estas sequências são em menor número e menos complexas que as dos eucariontes.

#### Modelo do Operão:

Em 1961, François Jacob e Jacques Monod propuseram o Modelo do Operão como principal mecanismo de controlo da expressão dos genes em bactérias.

- Operão: unidade funcional constituída pelos seguintes elementos:
  - Genes estruturais: conjunto de genes que codificam proteínas com funções relacionadas, como, por exemplo, as várias enzimas de uma determinada via metabólica.
  - Promotor: sequência específica de nucleótidos do DNA à qual se liga a RNA polimerase e onde tem início a transcrição.
  - Operador: sequência de DNA que controla o acesso da RNA polimerase ao promotor e que permite activar ou desactivar a transcrição de todos os genes estruturais.
  - Gene Regulador: encontra-se a uma determinada distância do operão, tem o seu próprio promotor e codifica o repressor.

- Repressor: proteína alostérica com duas formas, uma activa e uma inactiva. É específico, reconhece e liga-se apenas ao operador de um determinado operão.
- A transcrição dos genes estruturais do operão origina uma longa molécula de RNAm. Este RNAm tem sinais de iniciação e de paragem que permitem individualizar as diferentes proteínas.
- Tipos de regulação dos genes em procariontes:
  - Regulação negativa: o operão é bloqueado pela forma activa do repressor. A ligação do repressor activo ao operador impede a ligação da RNA polimerase ao promotor e inibe a transcrição.
    - Operão repressível:
      - O repressor é sintetizado na forma inactiva, com pouca afinidade para o operador, o que permite a transcrição dos genes estruturais. O produto final da via metabólica funciona como co-repressor e, quando a sua quantidade aumenta, liga-se ao repressor e activa-o. O repressor activo liga-se ao operador e bloqueia a transcrição. Quando a quantidade do produto final diminui, a transcrição é retomada.
      - Processo de regulação característico de vias anabólicas que sintetizam produtos essenciais a partir de precursores. A suspensão da transcrição de genes que codificam um produto presente no meio em quantidade suficiente permite poupar recursos e energia, sendo essencial para a resposta à variação das condições ambientais e adaptação evolutiva.
      - Ex: Operão trp em *E.coli*.
    - Operão indutível:
      - O repressor é sintetizado na forma activa e liga-se ao operador, bloqueando a transcrição dos genes. Um indutor inactiva o repressor e induz a transcrição dos genes.
      - Processo de regulação característico de vias catabólicas. Genes que codificam enzimas são apenas transcritos se o substrato estiver presente.
      - Operão lac em *E.coli*.

Exemplo de Operação indutível: Acção do Operação da lactose em procariontes (regulação em resposta a factor externo):

- Num meio pobre em lactose, as moléculas de  $\beta$ -galactosidase (enzima que degrada a lactose) que existem no interior de uma célula de *E. coli* são em número reduzido.
  - Depois de se adicionar lactose ao meio, a célula rapidamente produz esta enzima, em grandes quantidades, para a sua degradação.
  - Quando a produção de  $\beta$ -galactosidase é induzida, são produzidas mais duas enzimas: uma permease e uma transacetilase.
  - Estas enzimas são codificadas por genes estruturais.
  - Para além de os três genes serem adjacentes no mesmo cromossoma, eles são também transcritos num único RNA policistrónico. Mas, enquanto não houver lactose no meio, esses genes não são expressos.
  - No processo de regulação negativa, em operações como o da lactose, e na ausência de substrato, uma proteína repressora liga-se ao operador, impedindo que a RNA polimerase se ligue ao promotor, de tal forma que a transcrição não ocorre. Esta proteína repressora resulta do chamado gene regulador (ou gene *I* ou *lac I*), situado próximo dos genes estruturais.
  - O repressor liga-se a uma região do DNA próxima do gene que codifica para a  $\beta$ -galactosidase e perto do ponto em que se inicia a transcrição do RNA policistrónico. É a especificidade do repressor (o repressor tem a capacidade de reconhecer uma sequência específica de DNA, ou seja, um operador específico) que determina que este se ligue ao ponto no DNA próximo do gene que ele controla, e não noutro local ao longo do cromossoma.
  - Estando o repressor ligado ao operador é impedida a transcrição do DNA pela RNA polimerase.
  - Derivados da lactose, ou a própria lactose, podem ligar-se ao repressor, alterando a sua configuração. Assim, este deixa de ter afinidade com o operador, e permite a ligação da RNA polimerase ao promotor, possibilitando a transcrição do operação.
- Regulação positiva: uma proteína reguladora, o regulão, estimula directamente a expressão dos genes
- O regulão é activado pela ligação de uma molécula específica. Na sua forma activa, liga-se a um local a montante do promotor, facilitando o acesso da RNA polimerase ao promotor e induzindo a transcrição.
  - Um mesmo regulão actua em diferentes operações.

## Regulação em Eucariontes:

- Apenas uma pequena parte do genoma dos eucariontes é ocupada por genes que codificam proteínas. No entanto, o número de proteínas produzidas pelos eucariontes excede largamente o número de genes. Este facto pode ser explicado tendo em consideração o seguinte:
  - os exões codificam sequências de aminoácidos, designadas domínios, que podem fazer parte de mais do que uma proteína. Diferentes combinações de exões formam diferentes proteínas;
  - sequências de DNA, que funcionam como intrões num determinado contexto, podem funcionar como exões e codificar proteínas num contexto diferente.

## A regulação da expressão génica como resposta a factores internos e externos

- A maioria do material genético de uma célula não se expressa, encontrando-se reprimido.
  - Este controlo da expressão genética está na origem da diferenciação celular, permitindo que só os genes específicos de um tecido sejam expressos nas células que o compõem. Assim, a expressão génica é o principal factor que determina as características estruturais, funcionais e comportamentais de uma célula, sendo a responsável pela ontogenia celular (história do desenvolvimento de um organismo ao longo da sua vida).
- Numa dada célula, um gene pode exprimir-se só em determinados estádios de desenvolvimento ou em resposta a factores externos, como a modificação das condições ambientais.
- Acção das hormonas esteróides (regulação em resposta a factor interno):
  - são produzidas nas glândulas reprodutoras e libertadas na corrente sanguínea, onde podem alcançar todas as células;
  - possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática e de se ligarem a receptores no interior da célula. O complexo que se forma pode entrar no núcleo pelos poros e ligar-se ao DNA, estimulando a expressão de genes específicos, cujas proteínas serão responsáveis pelo desenvolvimento de algumas características sexuais.
- Acção do Calor em eucariontes (regulação em resposta a factor externo):
  - Quando as células se encontram sujeitas a temperaturas superiores a 42°C, mesmo que por curtos períodos de tempo, sofrem alterações nas suas proteínas. Estas adquirem outras conformações e podem deixar de ser funcionais, o que pode levar a morte celular.

- Nestas situações, é activada a expressão de genes que originarão proteínas com capacidade de reverter as conformações incorrectas de outras proteínas e assim impedir a sua acumulação e consequentemente mau funcionamento celular.

#### Transcrição em células eucarióticas. Caracterização dos transcritos formados:

A transcrição consiste na síntese de moléculas de RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossomal (rRNA) e RNA de transferência (tRNA), a partir da molécula de DNA. Os mecanismos subjacentes a este processo possuem um carácter universal, consistindo na polimerização orientada e sequencial dos nucleótidos trifosfato de ribose (ATP, GTP, CTP e UTP), efectuada pelas RNA polimerases, e usando como molde as sequências nucleótídicas das cadeias de DNA.

Nas células eucarióticas existem quatro RNA polimerases, uma para cada tipo de RNA a sintetizar: polimerase I (rRNA), II (mRNA), e III (tRNA e snRNA - pequenas RNA nucleares) e IV (transcrição dos genes do DNA mitocondrial). O processo de transcrição é efectuado em três etapas: iniciação, alongação e terminação das cadeias polinucleotídicas de RNA sintetizado.

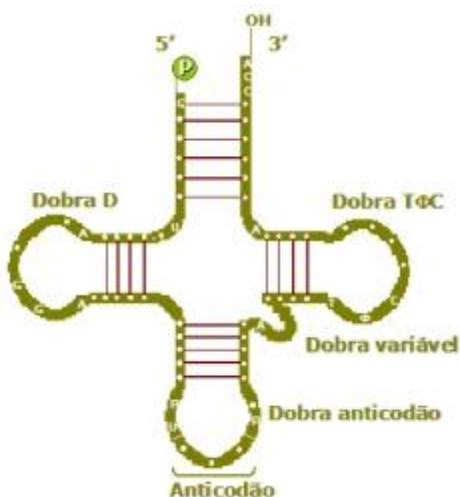
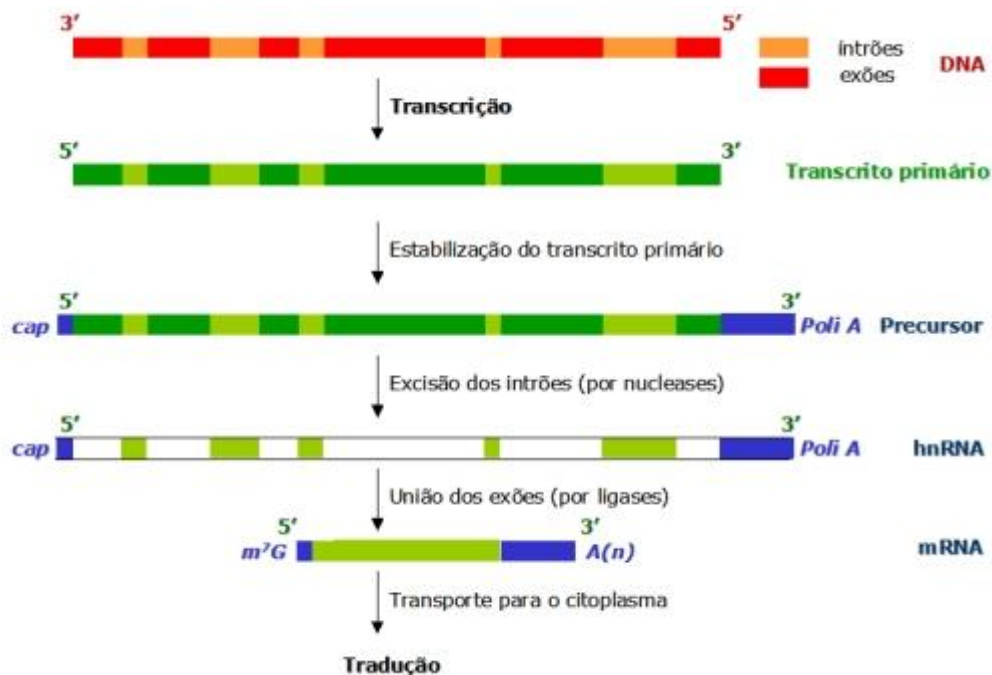
No que se refere à síntese de mRNA, a RNA polimerase II liga-se ao DNA por reconhecimento de sequências específicas, designadas promotoras, localizadas no DNA a montante do local de iniciação da transcrição. Nestas regiões, ocorrem interacções entre a RNA polimerase e determinadas proteínas reguladoras (factores de regulação). Após ligação, a cadeia dupla helicoidal de DNA sofre desenrolamento e desnaturação, possibilitando deste modo a formação de duas cadeias simples de DNA, uma das quais servirá de molde para a síntese do mRNA. De seguida, os nucleótidos precursores livres, existentes no nucleoplasma, são ligados entre si de forma sequencial pela acção da RNA polimerase II e por complementaridade com a sequência nucleotídica da cadeia simples de DNA molde. O processo termina quando a enzima RNA polimerase II reconhece uma sequência de terminação específica.

Em eucariotas, o mRNA é sintetizado numa forma “imatura”, o hnRNA (RNA nuclear heterogéneo), o qual posteriormente é sujeito no núcleo da célula a um processamento que inclui:



1. modificação da extremidade 5' pela adição de um nucleósido alterado (7 metilguanosina, terminal cap);
2. adição na extremidade 3' do transcrito de uma cauda de adeninas (poliadenilação);
3. remoção das regiões não codificantes (intrões) do mRNA precursor e colagem das regiões codificantes, exões (*splicing*).

Por fim, o mRNA processado é transportado do núcleo para o citoplasma da célula, onde ocorre a tradução da informação genética nele contida.



As moléculas tRNA são sintetizadas no núcleo pela acção da RNA polimerase III e o seu processamento envolve a adição de uma sequência CCA no terminal 3' de todas as moléculas. Ocorre ainda a metilação enzimática, através da S-adenosilmetionina, em

aproximadamente 1% das unidades ribose. Por outro lado, é também efectuada a modificação de algumas bases que facilitam o estabelecimento da sua estrutura. O número de moléculas de tRNA é superior ao número de codões com significado (61), sendo nas células eucarióticas superior a 70. Todas as moléculas de tRNA podem assumir uma estrutura secundária em folha de trevo, apresentando 4 zonas de emparelhamento entre bases complementares e 3 dobras, uma das quais inclui um tripleto nucleotídico (anticodão), determinante na incorporação correcta do aminoácido na proteína.

Na síntese do rRNA, tanto as células eucarióticas como procarióticas sintetizam moléculas precursoras de elevado peso molecular que posteriormente são processadas em RNAs ribossomais, através de clivagens endo- e exo-nucleolíticas.

Existem 4 tipos de moléculas de RNA nas células eucarióticas: 28 S, 18 S, 5,8 S, e 5 S (as partículas subunitárias são geralmente designadas de acordo com o respectivo coeficiente de sedimentação). Destas moléculas, 3 (28 S, 18 S e 5,8 S) são sintetizadas no nucléolo, a partir de um transcrito primário (rDNA), que é dividido em três moléculas maduras de RNA. Estas moléculas combinadas com a molécula 5 S (sintetizada no núcleo) e com proteínas ribossomais constituem as subunidades ribossomais primárias 40 S e 60 S, dos ribossomas, as quais são transportadas para o citoplasma e assumem o seu papel na síntese de proteínas. As duas subunidades ribossomais são combinadas apenas na presença do mRNA e dos tRNAs activados (sob a forma de aminoacil-tRNA) e desempenham um papel fundamental na selecção dos sinais de início da tradução.

O ribossoma (estrutura não membranar) constitui a “fábrica” de síntese de proteínas, através da informação vinculada no RNA mensageiro (mRNA).

Comparação entre procariotas e eucariotas no que se refere ao processo de transcrição.

	<b>Procariotas</b>	<b>Eucariotas</b>
<b>Região promotora mRNA</b>	Caixa Pribnow – região –35 a –10 (TATAAT)	Caixa Hogness – TATA (-25); caixa CAAT (-75) (nem sempre presente)
<b>RNA-polimerase</b>	Monocistrónico (codifica a síntese de apenas uma proteína) e policistrónico	Monocistrónico
	Apenas uma	RNA polimerase I – rRNA RNA polimerase II– mRNA RNA polimerase III – tRNA RNA polimerase IV – DNA mitocôndrial
<b>Estabilização do mRNA</b>	Inexistente	Modificação da extremidade 5' com metilguanossina (capping) e adição de uma longa cadeia de adeninas (poliadenilação)
<b>Iniciação</b>	Ligação da RNA-polimerase ao promotor (factor s)	Ligação da RNA-polimerase ao promotor, após a ligação de proteínas de iniciação ao DNA
<b>Intrões</b>	Inexistentes	Eliminados através do processo de splicing
<b>Localização</b>	Ocorre acoplada à tradução	Citoplasma
<b>Controlo</b>	Simples	Complexo, através da ligação de factores de transcrição em vários locais das regiões dos promotores

## Abundância e variedades dos diferentes RNAs nas células:

### ❖ DNA:

- Armazenamento e transmissão da informação genética.
- Encontrado nos cromossomas e em pequenas quantidades nas mitocôndrias e cloroplastos.
- Encontra-se associado a proteínas histonas nos cromossomas das células eucariotas.
- A molécula de DNA é formada por duas cadeias anti-paralelas de nucleótidos, dispostas em hélice em torno de um eixo.
- A direcção das ligações 3' e 5' diéster-fosfato de uma cadeia é inversa em relação à da outra cadeia (cadeias antiparalelas).
- Pareamento: Adenina=Timina e Guanina=Citosina (ligadas por pontes de hidrogénio)
- Distância entre as bases: 0.34 nm; cada volta completa da hélice contém 10 nucleotídeos.
- A hélice dupla tem um diâmetro de 2nm.
- Factores que Mantêm a estabilidade da hélice:
  - bases (hidrofóbicas) dentro da hélice;
  - resíduos de desoxirribose (hidrofílicos) e ácido fosfórico (ionizado e hidrofílico) na periferia, em contato com a água intracelular;
  - pontes de hidrogênio - entre os dois filamentos polinucleotídicos da hélice dupla;
  - interação hidrofóbica das bases pareadas.

### ❖ RNA

- Filamento único; com a excepção de alguns vírus.
- *Três variedades:*
  - tRNA ( transferência)
  - mRNA (mensageiro)
  - rRNA (ribossómico)

### ❖ tRNA

- Um grupo de pequenas moléculas de RNA que funcionam como dadores de aminoácidos durante a síntese da proteína. Cada tRNA está covalentemente ligado a um aminoácido específico formando aminoacil-tRNA

- Função: transferir aminoácidos para as posições correctas nas cadeias polipeptídicas em formação nos polirribossomas.
- Combina-se com o aminoácido e é capaz de reconhecer no mRNA uma sequência de três bases - codão.
- A sequência de três bases no tRNA que reconhece o codão é designada por anti-codão.
- Para cada aminoácido existe pelo menos um tRNA.
- É um filamento com uma extremidade terminando pela sequência CCA - ácido adenílico (A) precedido de duas moléculas de ácido citidílico (C).
- Apresenta segmentos formados por uma hélice dupla (devido à formação de pontes de hidrogênio).
- Representação plana - folha de trevo (com o anticodão numa extremidade).

#### ❖ mRNA

- Qualquer RNA que especifica a ordem dos aminoácidos numa proteína (a estrutura primária).
- Produzido por transcrição do DNA pela RNA polimerase.
- Nos eucariotas, o produto inicial de RNA (transcrito primário) sofre o processamento para produzir o mRNA funcional.
- Representa a transcrição de um segmento de uma das cadeias da hélice de DNA.
- A molécula de mRNA é bem maior do que a de proteína por ele formada (p/q são necessários 3 nucleótidos para codificar um aminoácido).
- Cada mRNA tem uma cauda de poli-A (vários ácidos adenílicos) adicionada no interior do núcleo celular.
- Na outra extremidade do mRNA (extremidade 5'), um pequeno capuz (*cap*) nucleotídico é adicionado por outras enzimas.
- O DNA transcreve os mRNAs que vão ser traduzidos em proteínas.

### ❖ rRNA

- É muito mais abundante do que os outros tipos de RNA.
- Constitui 80% do RNA celular.
- Existe combinado com proteínas, formando os ribossomas.
- Quando presos a filamentos de mRNA, os ribossomas formam os polirribossomos, onde tem lugar a síntese de proteínas.
- Cada ribossoma é constituído por duas subunidades que se prendem de modo reversível no início da síntese da molécula protéica, separando-se quando a proteína está terminada.
- Os ribossomos das mitocôndrias e dos cloroplastos são iguais aos das células procarióticas.

De um modo geral:

- O mRNA leva a informação genética (do núcleo para o citoplasma celular) para a sequência de aminoácido;
- O tRNA identifica e transporta os aminoácidos até os polirribossomas, que fornecem suporte molecular para a síntese protéica.

### ❖ RNAp

- Uma enzima copia uma fita de DNA (a fita molde) para fazer a fita de RNA complementar usando como substrato ribonucleosídeos trifosfatados

### Mecanismos moleculares de transcrição pelas RNA Polimerase I, II e III e modificações pós transcricionais dos transcritos primários.

Nos núcleos das células Eucarióticas, encontram-se três tipos de RNA polimerase DNA dependentes:

1) A *RNA polimerase I*, responsável pela síntese de cerca de 80% da totalidade do RNA celular, localiza-se no nucléolo, transcrevendo os genes dos RNA ribossomais, que conduzem à produção dos rRNA 18S; 5,8S e 28S. Esta polimerase é insensível à inibição pela  $\alpha$ -amanitina.

2) A *RNA polimerase II*, responsável pela síntese de cerca de 2% do RNA celular, localiza-se no nucleoplasma, e catalisa a síntese dos produtos primários precursores

dos RNA mensageiros, que dão origem ao hmRNA nuclear. A RNA polimerase II é inibida pela  $\alpha$ -amantina a baixa concentração ( $\sim 0,1 \mu\text{g. ml}^{-1}$ ).

3) A RNA polimerase III, responsável pela síntese de cerca de 20% dos RNA celulares, está igualmente localizada no nucleoplasma, e catalisa a síntese dos RNA de transferência tRNA e outros pequenos RNA que incluem o rRNA 5S, o snRNA e snoRNA. A RNA polimerase III animal é sensível à inibição pela  $\alpha$ -amantina a concentrações de  $\sim 500 \mu\text{g ml}^{-1}$ , mas a RNA polimerase III de levedura e a de insecto são insensíveis a este inibidor

#### Mecanismos de regulação de transmissão em células eucariótica:

Nos organismos superiores, assiste-se, ao longo da vida, a importantes fenómenos de diferenciação celular e desenvolvimento que dão origem aos diversos fenótipos celulares. O fenótipo celular, caracterizado pelo conjunto de funções específicas de célula diferenciada, resulta do perfil qualitativo e quantitativo das proteínas produzidas na célula, a cada instante. Os mRNA que lhes dão origem exprimem-se a partir de um mesmo genoma, comum a todas as células do organismo. A importante diversidade fenotípica gerada resulta da expressão diferencial e muitas vezes sequencial de genes ou de grupos de genes que actuam em cascata.

Está actualmente demonstrado que é principalmente a nível de transcrição que se dá o controlo da expressão genética subjacente à diferenciação celular e ao desenvolvimento dos organismos superiores.

Este modo de controlo da actividade dos genes pode ser demonstrado experimentalmente, com o recurso a métodos aplicáveis ao estudo tanto de procariotas como eucariotas, permitindo determinar directamente o RNA transcrito de um determinado gene e a acumulação de proteína correspondente.

Está provado que a regulação da transcrição dos genes resulta em última análise da intervenção de factores proteicos que interagem com sequências nucleotídicas específicas situadas na maior parte das vezes a montante dos genes, e que constituem sítios promotores da transcrição, assim como as próprias RNA polimerases.

#### Descoberta do Código Genético:

Em 1865, Gregor Mendel estabeleceu pela primeira vez os padrões de hereditariedade de algumas características existentes em ervilheiras, mostrando que obedeciam a regras estatísticas simples. Embora nem todas as características mostrem estes padrões de hereditariedade mendeliana, o trabalho de Mendel provou que a aplicação da estatística à genética poderia ser de grande utilidade. Desde essa altura, padrões mais complexos de hereditariedade foram demonstrados.

A partir da sua análise estatística, Mendel definiu o conceito de alelo como sendo a unidade fundamental da hereditariedade. O termo "alelo" tal como Mendel o utilizou, expressa a ideia de "gene", enquanto nos nossos dias ele é utilizado para especificar uma variante de um gene.

Só depois da morte de Mendel é que o seu trabalho foi redescoberto, entendido (início do século XX) e lhe foi dado o devido valor por cientistas que então trabalhavam em problemas similares.

Mendel não tinha conhecimento da natureza física dos genes. Actualmente sabemos que a informação genética está contida no DNA e manipulação desse mesmo DNA pode alterar a hereditariedade e as características dos organismos.

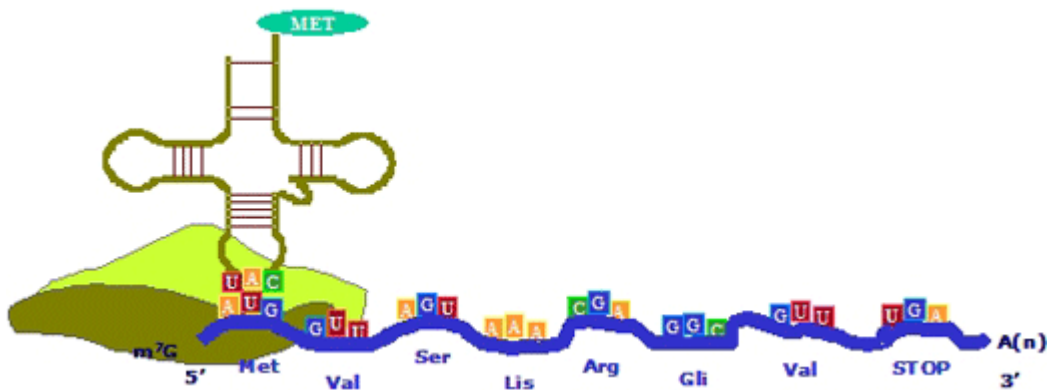
#### Mecanismo molecular de tradução:

A tradução ocorre em três etapas (iniciação, alongamento e terminação), nas quais a informação presente no mRNA e organizada em codões (conjunto de 3 nucleótidos), é reconhecida pelos anticodões presentes nos tRNA's que transportam os resíduos de aminoácidos. Cada codão do mRNA e o respectivo aminoácido são incapazes de se "reconhecer" mutuamente, sendo necessário um "adaptador" que possibilite esse reconhecimento. Esta função de "adaptador" é então executada por moléculas de tRNA que servem de ponte entre os aminoácidos e o mRNA, de forma a ser permitida a tradução da informação codificada no mRNA, em proteína nos ribossomas.

O processo de síntese proteica é iniciado em geral pelo codão AUG (codão de iniciação) que especifica, tendo por base o código genético, o aminoácido metionina. Todas as proteínas recém-sintetizadas contêm metionina como primeiro aminoácido, que é frequentemente clivado pouco depois por uma amino peptidase.

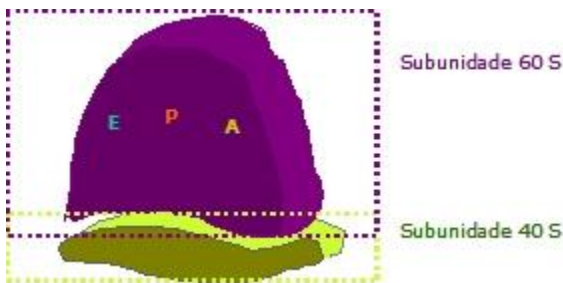
A tradução é iniciada com a formação de um complexo de iniciação ao nível do codão de iniciação (AUG), que consiste na cadeia de mRNA, num tRNA com o anticodão complementar (UAC) e carregado com o primeiro aminoácido (metionina) (*vide* formação do complexo aminoacil-tRNA); e na ribossomal 40 S, ligados numa sequência de reconhecimento específica do mRNA (terminal *cap*). Nos eucariótas, o tRNA iniciador (tRNAMet) é inicialmente posicionado na subunidade 40 S com a ajuda de um factor de iniciação (eIF), ainda antes da ligação ao mRNA.





Após a formação do complexo de iniciação dá-se a ligação da subunidade ribossomal 60S a este complexo (formando-se o complexo de início 80S, vide ribossomas) e é iniciada a etapa de alongamento da cadeia peptídica. Nesta altura os factores de início desligam-se e o ribossoma está pronto a receber o segundo aminoacil-tRNA e a formar a primeira ligação peptídica catalizada por uma peptidil-transferase.

As duas subunidades do ribossoma contêm 3 locais adjacentes para a associação às moléculas de tRNA: locais aminoacilo (A), peptídico (P) e de saída (E). No decorrer do processo, as moléculas de tRNA ligam-se numa primeira fase ao local A, sendo depois deslocadas para o local P e finalmente para o local E.



A elongação tem início quando o anticodão do segundo aminoacil-tRNA encontra o local A, complementar do codão do mRNA existente nesta posição. Este processo é dependente de GTP e de determinados factores de elongação. Simultaneamente, o primeiro t-RNA é deslocado para o local P (e libertado posteriormente através do local E) ficando o peptidil-tRNA na posição A. Seguidamente, o ribossoma desloca-se uma distância equivalente a um tripleto, em relação ao mRNA, o que expõe o codão seguinte (local A) e permite a aceitação de um novo aminoacil-tRNA no local A.

A terminação da síntese da cadeia peptídica ocorre quando, ao nível do local A, surge um dos codões de terminação (UAA, UAG e UGA). Para cada um dos referidos 3 codões não existe correspondência para nenhum dos aminoácidos (ver código genético) e a síntese proteica é bloqueada. A terminação requer um factor de dissociação (e-RFn), que se liga ao

ribossoma na presença de GTP. Com a formação deste complexo, o factor de dissociação tem a capacidade de reconhecer o codão de terminação e induzir a hidrólise da ligação aminoacil simultaneamente com a hidrólise do GTP com subsequente libertação do polipéptido e do complexo RF+GDP.

Posteriormente à sua síntese, a proteína nascente pode sofrer modificações pós-tradução (proteólise parcial e glicosilação), as quais são essenciais para que essa mesma proteína se possa tornar biologicamente activa.

### Capítulo III: Genética Molecular – Mecanismo de síntese do DNA

O DNA é um polímero de nucleótidos unidos entre si por ligações de hidrogénio, nas células estão dispostos em dupla fita sendo que cada fita esta orientada em sentido contrario a outra, por este motivo é dito anti-paralelo, os nucleótidos são compostos por açúcares – as pentoses, radicais fosfatos e bases azotadas As bases azotadas são:

- Adenina;
- Guanina;
- Citosina;
- Timina.

Os nucleótidos de uma fita da molécula de DNA podem interagir com os nucleótidos da fita complementar através de pontes de hidrogénio entre suas bases azotadas, sendo que a Adenina se liga por meio de duas pontes de hidrogénio à Timina, e a Citosina se liga através de três pontes com a Guanina.

A replicação semi-conservativa do DNA exige que duas cadeias polinucleotídicas que formam a hélice do DNA se separem, de modo a expor as bases que irão orientar o emparelhamento dos nucleótidos para formação das novas cadeias complementares às cadeias moldes.

A separação de duas cadeias da hélice do DNA ocorre à medida que as novas cadeias vão sendo sintetizadas. A região de separação das cadeias tem a forma de uma letra Y e é denominada forquilha de replicação.

## Síntese Semi-descontínua de DNA

Experiências mostraram que ambas as cadeias filhas são sintetizadas na forquilha de replicação por um complexo de enzimas que inclui a polimerase III do DNA. No entanto, as duas cadeias moldes são antiparalelas, Numa delas a síntese da cadeia complementar ocorre no sentido  $5' \Rightarrow 3'$ , mas na outra cadeia essa síntese teria que se dar no sentido inverso, ou seja,  $3' \Rightarrow 5'$ . Contudo, as duas cadeias são sintetizadas pela polimerase III do DNA, que só catalisa o crescimento da cadeia no sentido  $5' \Rightarrow 3'$ .

A explicação para esse paradoxo é que, na forquilha de replicação, uma das cadeias é sintetizada continuamente por uma polimerase que se move no mesmo sentido do deslocamento da forquilha. Já a cadeia com polaridade inversa é sintetizada no sentido inverso ao do deslocamento da forquilha de replicação, portanto, também no sentido  $5' \Rightarrow 3'$ . Isso é possível porque, nesse último caso, a polimerase sintetiza segmentos polinucleotídicos curtos, que são, posteriormente, unidos para formar a nova cadeia contínua.

Na figura abaixo podemos ver as duas cadeias sintetizadas no sentido  $5' \Rightarrow 3'$ .

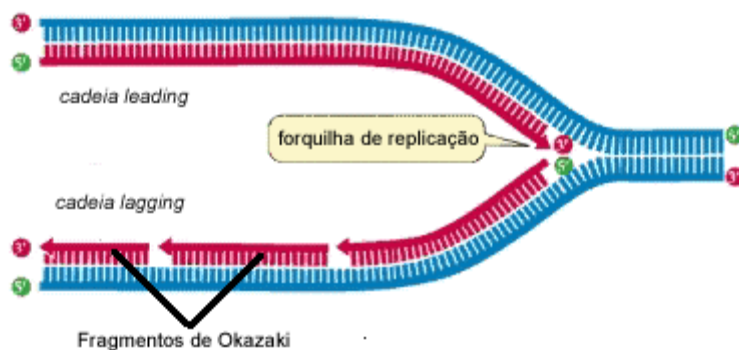


Figura 1 -Replicação do DNA. Ambas as cadeias são sintetizadas no sentido  $5' \Rightarrow 3'$ . A cadeia leading é sintetizada continuamente, enquanto a cadeia lagging é sintetizada descontinuamente.

A cadeia que cresce no mesmo sentido que o deslocamento da forquilha de replicação, e cuja síntese ocorre continuamente, é chamada de cadeia leading

A cadeia que cresce no sentido oposto ao deslocamento da forquilha de replicação, e cuja síntese ocorre descontinuamente, é chamada de cadeia lagging.

Esse modo de replicação do DNA, em que uma das cadeias é sintetizada continuamente e a outra, descontinuamente, é chamado de síntese semidescontínua. Costuma-se dizer também que a síntese do DNA na forquilha de replicação é assimétrica, pois numa das cadeias (cadeia leading) ela ocorre continuamente, enquanto que na outra (cadeia lagging) ela ocorre de modo descontínuo, em fragmentos. Esses fragmentos são denominados fragmentos de Okazaki.

## A descoberta dos fragmentos de Okazaki

A hipótese da síntese descontínua da cadeia lagging foi corroborada por uma experiência realizado pelo pesquisador Reiji Okazaki<sup>1</sup>, no final da década de 1960. Okazaki forneceu, a bactérias em divisão, timina tritiada, isto é, um desoxirribonucleotídeo com a base timina (=timidina) marcado com átomos de trítio (um isótopo radioactivo do hidrogénio).

Esse precursor do DNA, altamente radioactivo, foi deixado em contacto com as bactérias por apenas alguns segundos, de modo que somente o DNA recém-sintetizado, ou seja, aquele imediatamente após a forquilha de replicação, se tornasse radioativo. O DNA foi então isolado e analisado, mostrando que parte da radioactividade estava contida em fragmentos de cadeias polinucleotídicas, com cerca de mil a dois mil nucleótidos.

Quanto maior fosse o tempo de contacto das bactérias com o precursor radioactivo maior era quantidade de radioactividade em cadeias de DNA de grande tamanho. A conclusão foi que os nucleótidos eram primeiramente polimerizados em fragmentos de mil a dois mil nucleótidos, os quais eram, em seguida, reunidos para formar cadeias longas.

Esses pequenos pedaços de DNA que aparecem transitoriamente durante a síntese da cadeia lagging foram denominados fragmentos de Okazaki.

A replicação é um processo no qual uma molécula de DNA dupla fita é duplicado. Devido ao facto do DNA conter a "informação" que é fundamental para codificar todas as proteínas e RNAs necessários para se "construir" um organismo, é através da replicação que os seres vivos conseguem dar origem a um novo ser que possui as mesmas características de quem o originou. A replicação também explica como nós, seres multicelulares, fomos formados a partir de uma única célula - o zigoto. Portanto, a replicação do material genético é importante para todas as formas de vidas conhecidas. No entanto, os mecanismos de replicação dos procariotas e eucariotas não são idênticos. Como cada fita de DNA contem a mesma informação genética, qualquer uma das duas fitas podem servir como molde por isso a replicação do DNA é dita semi-conservativa.

Nas células a replicação deve acontecer antes da divisão celular. Em procariotas a replicação ocorre entre as divisões celular enquanto nos eucariotas ocorre na fase S da interfase. A replicação também pode ser reproduzida em laboratório através de um ensaio conhecido como PCR.

A replicação do DNA é dita semi-conservativa porque na formação de uma nova cadeia nucleotídica tem-se como referência uma cadeia nucleotídica molde (ou mãe) do DNA que está a ser replicado.

O DNA não se replica de forma autónoma. Para que o processo de replicação se inicie é necessário a actuação de uma enzima, a DNA polimerase. A enzima liga-se à cadeia de DNA e desliza sobre esta, quebrando as ligações entre as duas cadeias de nucleótidos - ligações por pontes de hidrogénio - ficando então as duas cadeias de DNA separadas. Em seguida, os nucleótidos livres existentes no núcleo ligam-se, por complementaridade de bases, às cadeias de DNA e a partir de uma cadeia original de DNA formam-se duas novas cadeias.

#### Etapas da Polimerização do DNA:

A replicação inicia-se numa zona da cadeia denominada triplete de iniciação, neste local as helicases começam a abrir a cadeia para ambos os lados da origem quebrando as ligações de hidrogénio existentes entre as bases complementares, formando-se um replicão que é constituído por duas forquilhas de replicação. Em seguida liga-se às cadeias de DNA a enzima RNA primase que vai sintetizar um primer que consiste numa sequência de bases de RNA que vão iniciar a síntese visto que a DNA polimerase III não tem a capacidade de o fazer, devido a ausência de grupos hidroxilos -OH expostos. Após a síntese do primer a DNA polimerase III vai continuar o processo que ocorre no sentido da extremidade 5' para a extremidade 3' da nova cadeia. Como a DNA polimerase vai actuar para ambos os lados da origem de replicação, por cada cadeia simples de DNA existente vai existir uma parte da nova cadeia que vai ser sintetizada na direcção da replicação, essa cadeia é sintetizada de modo contínuo e denomina-se cadeia contínua e existe uma outra parte da cadeia em que a direcção da replicação é contrária à direcção da síntese, esta cadeia vai ser sintetizada descontinuamente, isto é, a RNA primase vai sintetizar vários primer's ao longo da cadeia começando o mais próximo da origem de replicação e terminando no mais distante e a partir daí vão formar-se fragmentos, denominados fragmentos de Okazaki constituídos pelo DNA, enquanto que entre estes fragmentos vão ainda existir os primer's, que serão removidos e substituídos por DNA, pela acção de uma outra DNA polimerase, a DNA Polimerase I. Como a DNA polimerase não consegue estabelecer a ligação entre esses nucleótidos e os que se encontram nas extremidades dos fragmentos de Okazaki, formam-se lacunas entre o grupo fosfato de um, e o carbono 3' do outro. Esses nucleótidos são posteriormente ligados pela DNA ligase. A esta cadeia chama-se cadeia descontínua. As

partes finais da cadeia de DNA denominadas telómeros são sintetizadas pela RNA telomerase por um processo de transcrição inversa, isto é, esta enzima sintetiza DNA tendo por molde RNA. Durante todo o processo de replicação actuam outras enzimas entre elas as SSB e as topoisomerasas que têm como função evitar o enrolamento da cadeia durante a síntese.

---

## Replicação

Cada fita de um duplex de DNA parental actua como molde para a síntese de uma fita-filha e permanece unida a esta nova fita, formando um duplex com a mesma (mecanismo semi-conservativo). As novas fitas são sintetizadas no sentido  $5' \rightarrow 3'$ .

A replicação tem início numa sequência denominada de origem. Cada molécula de DNA cromossómico eucariótico contém múltiplas origens de replicação.

As DNA polimerases, diferentemente das RNA polimerases, não são capazes de promover o desenrolamento das fitas de duplex de DNA e não podem iniciar a síntese de novas fitas complementares sobre as fitas-molde.

Numa forquilha de replicação, uma fita-filha sofre replicação contínua. A outra fita (fita retardada) é formada a partir de uma série de fragmentos de Okazaki descontínuos, a partir de iniciadores sintetizados com algumas centenas de nucleótidos entre eles.

Os ribonucleótidos da extremidade  $5'$  de cada fragmento de Okazaki são removidos e substituídos pela expressão da extremidade  $3'$  do fragmento de Okazaki seguinte. Como etapa final, os fragmentos de Okazaki adjacentes são unidos pela DNA ligase.

As hélices usam a energia da hidrólise de ATP para a separação das fitas parentais (molde) de DNA. A primase sintetiza um pequeno iniciador que tem, inicialmente, a sua extremidade  $3'$  estendida por uma DNA polimerase  $\alpha$ , resultando numa pequena fita-filha.

A maioria do DNA das células eucarióticas é sintetizada pela Pol $\delta$ , que substitui a Pol $\alpha$  e continua a extensão da fita-filha no sentido  $5' - 3'$ . A Pol $\delta$  permanece estável associada ao molde por meio da ligação de uma proteína Rfc que, por sua vez, se associa à PCNA, a uma proteína trimétrica que circula a dupla hélice de DNA resultante.

A replicação de DNA geralmente ocorre por um mecanismo bidireccional no qual duas forquilhas de replicação são formadas sobre a origem e se movem em sentidos opostos, e as duas fitas-molde são copiadas em cada forquilha.

A síntese do DNA eucariótico in vivo é regulada pelo controle da actividade das hélices MCM que iniciam a replicação de DNA em origens múltiplas, espaçadas sobre o DNA cromossómico.

### Mecanismo geral e molecular de replicação em procarióticas e eucarióticas:

Em células eucarióticas, a replicação do genoma ocorre durante uma subfase específica do ciclo celular, a fase S. dada a extensão do genoma eucariótico, a replicação inicia-se simultaneamente em múltiplos sítios, de modo a assegurar a replicação da totalidade do genoma num intervalo de tempo correspondente à duração da fase S, aproximadamente 6-8 horas. A identificação de sequências que funcionam como origens de replicação foi efectuada com sucesso em leveduras, sendo ainda insuficiente a sua caracterização em eucariotas superiores.

Nos eucariotas, a activação das diferentes origens de replicação obedece a um complexo programa de regulação temporal e espacial, ainda insuficientemente compreendido. Os estudos iniciais sobre a replicação de genomas eucarióticos utilizaram a técnica de autorradiografia de fibras de DNA que, quando conjugada a metodologia de pulso-caça, permite acompanhar a dinâmica de replicação do DNA e a individualização de replicões. Estes trabalhos demonstraram:

- 1) Que os replicões ocorrem em agregados;
- 2) Que as origens de replicação de um mesmo agregado são activas simultaneamente;
- 3) Que agregados de replicões diferentes podem ser replicados em períodos diferentes da fase S.

Para um mesmo tipo celular mantendo-se o padrão de actividade transcricional, sequências de DNA específicas são replicadas também em subfases específicas da fase S. No seu conjunto, estes dados indicam que os agregados de replicões que são um reflexo de organização especial do genoma, correspondem a unidades funcionais genómicas, sujeitas a um programa de activação temporal bem definido. Este conceito funcional aplicado aos replicões é reforçado pelo achado que estes correspondem, frequentemente, a unidades transcricionais, situando-se as zonas de iniciação de replicação na proximidade de elementos de regulação transcricional.

Para o estudo da replicação do DNA no interior do núcleo tem sido utilizado a incorporação de precursores modificados em núcleos intactos ou permeabilizados, com subsequente detecção do DNA substituído por técnicas imunocit químicas. Os resultados obtidos com esta abordagem demonstraram que a síntese de DNA ocorre, simultaneamente, em numerosos sítios discretos do núcleo, denominados focos de replicação. Este achado é compatível com os da autorradiografias de fibras de DNA que demonstraram que em eucarióticas se verifica actividade simultânea de múltiplos replicões dispersos no genoma. A comparação do numero de focos de replicação do número estimado de replicões em actividade dado momento permitiu sugerir que cada foco de replicação corresponde aproximadamente a 40 replicões.

No início da fase S, os focos de replicação são pequenos e numerosos e distribuem-se mais ou menos, homogeneamente pelo nucleoplasma, sobre regiões eucromáticas. Na segunda metade da fase S, os focos são maiores dimensões e menos numerosos e organizam-se

segundo padrões variáveis o tipo celular, dependendo da distribuição da heterocromatina sobre a qual se localizam. De um modo geral a heterocromatina associada ao nucléolo replica-se na porção intermédia nucleoplasmática e heterocromatina periférica podem dependendo do tipo celular, replicar quer na porção intermédia, quer na porção terminal da fase S.

O estudo da replicação do DNA no contexto do núcleo celular permite concluir que sequências que replicam numa subfase específica da fase S têm um arranjo espacial característico, segundo padrões morfológicos que correspondem a compartimentos cromatínicos individualizáveis. Uma vez que em cada subfase da fase S se replicam conjuntos de sequências bem definidas, os dados obtidos nos estudos de replicação *in situ* apontam para um elevado nível de organização tridimensional do genoma interfásico. Indicam também que a activação de agregados de replicões ocorre de forma integrada com a sua distribuição em compartimentos nucleares distintos. No seu conjunto sugerem um papel para a organização do núcleo na replicação do genoma.

#### Mecanismos de Reparação do DNA:

Todos os organismos vivos possuem DNA, e todas as moléculas de DNA possuem um mecanismo de reparação que evita que ocorram erros no momento da sua duplicação.

Os mecanismos de reparação do DNA são guiados, principalmente, por proteínas codificadas pelo próprio DNA (entre as quais, a DNA-Polimerase é a principal). Estas proteínas reconhecem eventuais danos na sequência de nucleótidos durante o processo de replicação, e actuam promovendo a substituição da área danificada por uma semelhante à original. O processo possui uma margem de erro mínima, e evita que haja morte celular ou mutações decorrente de tais danos.

Há casos em que os danos não podem ser reparados naturalmente (como no caso de quebras na cadeia de DNA causadas por radiações ionizantes, ou no caso do surgimento de dímeros de pirimidina), e nestes casos a replicação (também coordenada pela mesma DNA-Polimerase) é abortada e a célula morre. Mas há casos em que simples trocas, inversões, adições ou deleções de sequências de nucleótidos passam despercebidas pelos mecanismos de reparação, fazendo com que a célula se reproduza mesmo com DNA danificado, gerando linhagens mutantes, nas quais a DNA-Polimerase reconhecerá a área afectada como "normal".

❖ Reparação antes da replicação:



## Mecanismos de reparação do DNA

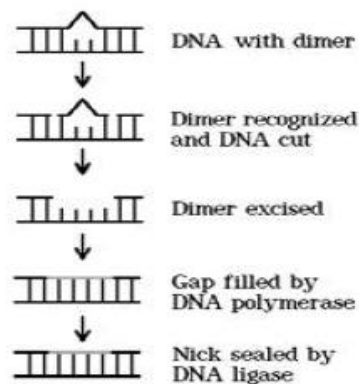
### i) Fotorreactivação

Em *E.coli* danos causados por UV são revertidos parcialmente se as células, após a radiação UV, são expostas a luz na banda do azul, do espectro visível. O processo é dependente da activação de uma proteína – enzima de fotorreactivação (PRE). A reparação por fotorreactivação parece não ser essencial em *E.coli*. A enzima PRE não foi detectada em eucariotas.

### ii) Reparação por excisão de bases azotadas e de nucleótidos

Mecanismo de reparação do DNA em procarióticas e eucariotas, não dependentes da luz

- O erro existente numa das cadeias da dupla hélice do DNA é reconhecido e removido por acção de uma nuclease;
- Uma DNA polimerase (DNA polimerase I em *E.coli*) preenche o local de excisão, colocando nucleótidos por complementaridade com os da cadeia intacta;
- A enzima DNA ligase estabelece a ligação entre a extremidade 3'-OH da sequência de nucleótidos inserida e a restante cadeia.



A reparação por excisão de bases azotadas (BER) reconhece e substitui pequenas alterações nas bases azotadas do DNA, resultantes de mutações espontâneas ou da acção de agentes químicos.

Estes erros não impedem a replicação e transcrição do DNA.

A reparação por excisão de nucleótidos (NER) está relacionada com a reparação de mutações que distorcem a configuração normal da molécula de DNA, como as ocasionadas por radiação UV.

Estes erros impedem a replicação e transcrição do DNA.

- ❖ Reparação após a replicação: reparação mismatch, reparação por recombinação e sistema de reparação SOS

Um dos erros mais comuns consiste na inserção, pela DNAPolimeraseIII, de um nucleótido errado (não complementar). Em bactérias este tipo de erro ocorre 1 vez em cada 100 000 inserções ( $1 \times 10^{-5}$ ).

A própria enzima tem capacidade para rever e corrigir os erros (proofreading), comportando-se como uma exonuclease. Assim cerca de 99% dos erros são corrigidos. A taxa de erro final é de  $\sim 1 \times 10^{-7}$ .

#### i) Reparação mismatch

Mecanismo proposto por Robin Holliday no final dos anos 70 para explicar a correcção de erros resultantes da inserção errada de nucleótidos na replicação.

O par de nucleótidos não complementar é reconhecido, mas o sistema de reparação sabe qual deles é o incorrecto. (????? CHINÊS!!!!)

Em E.coli o processo de reconhecimento baseia-se na metilação do DNA. Uma enzima, a adenina metilase, reconhece a seguinte sequência do DNA :



A enzima adenina metilase adiciona um grupo metilo(CH<sub>3</sub>) a cada nucleótido de adenina, modificação que é estável durante todo o ciclo celular.

Após um ciclo de replicação, as cadeias sintetizadas de novo permanecem temporariamente não metiladas, o que permite que a enzima de reparação bacteriana(DNAPolimeraseI) reconheça o erro. A DNAPolimerase liga-se à cadeia não metilada, e uma endonuclease corta o fragmento de DNA que contém o erro.

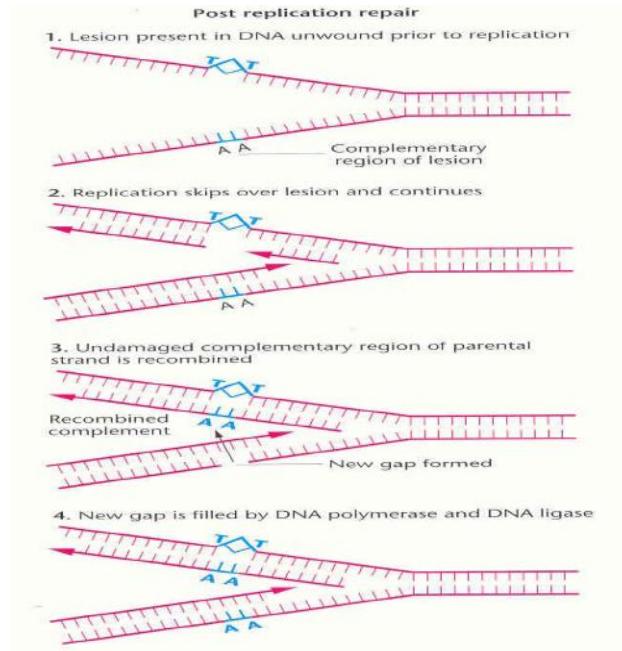
#### ii)Reparação por recombinação

Sistema de reparação proposto por Miroslav Radman em E. coli

Ocorre quando o dano na cadeia de DNA não foi corrigido por outros sistemas e a replicação ocorre com falhas.

A enzima RecA determina um processo de troca por recombinação, em que a falha na cadeia de DNA sintetizada de novo é preenchida pela inserção de um segmento da cadeia complementar intacta.

A falha criada na cadeia complementar é posteriormente preenchida pelo mecanismo de reparação que envolve a DNA polimeraseI e a DNA ligase



### iii) Sistema de reparação SOS

Sistema que em *E. coli* envolve um conjunto de DNA polimerases (Translesional polimerases) que permitem que a replicação prossiga apesar de existir um erro numa das cadeias do DNA.

### iv) Reparação de lesões em ambas as cadeias (double strand break repair)

Em células eucariotas, quando ambas as cadeias de DNA sofrem lesões (ex. radiação ionizante), um mecanismo de reparação utiliza o DNA do cromossoma homólogo não danificado para reparar a mutação.

O processo de reparação ocorre normalmente durante o final da fase S/ início de G2, após a replicação.

Em leveduras, sabe-se que estão envolvidas pelo menos 5 proteínas designadas complexo RAD52.

## Noção do ciclo celular / Mecanismos de divisão Celular: Mitose e Meiose:

### Processos de divisão nuclear

Em organismos unicelulares, a célula cresce ao absorver substâncias do meio e utilizando esses materiais na síntese de compostos celulares. Quando essas células atingem um dado tamanho dividem-se, obtendo-se duas células filhas com metade do tamanho, que crescerão e assim sucessivamente.

Em organismos multicelulares, pelo contrário, a divisão celular e o aumento do volume celular são o meio pelo qual o organismo cresce. Em todos os casos as células filhas são geneticamente iguais à célula progenitora.

A divisão celular consiste em dois processos sobrepostos ou consecutivos: mitose e citocinese. A mitose origina dois núcleos geneticamente idênticos, enquanto a citocinese separa o citoplasma, colocando os núcleos filhos em células separadas.

As células que se dividem activamente passam por uma sequência definida de acontecimentos, que se designa ciclo celular. Dependendo do tipo de célula, o ciclo requererá tempos diferentes. Factores externos, como a temperatura ou a disponibilidade de nutrientes também afectam a duração do ciclo e respectivas etapas.

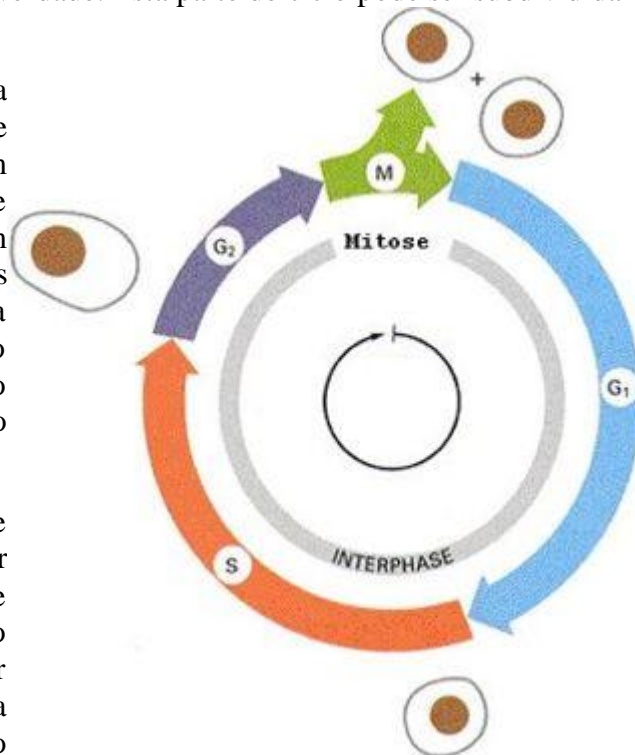
O ciclo celular divide-se em interfase e mitose (ocupando geralmente entre 5 e 10% do ciclo).

A interfase, ou seja, a fase entre duas divisões mitóticas, já foi considerada a fase de repouso da célula mas tal não é, de todo, verdade. Esta parte do ciclo pode ser subdividida em três partes:

- Fase  $G_1$  - a designação desta etapa deriva de gap = intervalo, e decorre imediatamente após a mitose. É um período de intensa actividade bioquímica, no qual a célula cresce em volume e o número de organitos aumenta. Para que a célula passe para a fase seguinte do ciclo é necessário que atinja um ponto crítico designado ponto de restrição ou start, momento em que se dão mudanças internas;

- Fase S - esta é a fase de síntese (S) de DNA e, aparentemente, requer um sinal citoplasmático para que se inicie. Cada cromossoma é duplicado longitudinalmente, passando a ser formado por dois cromátídeos. Nesta etapa numerosas proteínas são igualmente sintetizadas;

- Fase  $G_2$  - esta fase conduz directamente à mitose e permite formar estruturas com ela directamente relacionadas, como as fibras do fuso acromático.



## Mitose

A mitose é um processo contínuo mas geralmente consideram-se, por uma questão de facilidade, quatro etapas: Profase, Metafase, Anafase e Telofase. No decorrer destas etapas, o material genético sintetizado na fase S do ciclo celular é dividido igualmente por dois núcleos filhos. Este processo está associado à divisão de células somáticas.

A mitose é iniciada apenas em presença de um factor promotor da mitose (MPF) proteico citoplasmático, que provoca a condensação dos cromossomas. As variações de concentração de MPF estão relacionadas com as variações de uma outra proteína conhecida por ciclina. Aparentemente, quando a ciclina atinge uma certa concentração no citoplasma, o MPF é activado. Durante a mitose a ciclina é rapidamente destruída, aumentando novamente durante o ciclo seguinte.

Um dos primeiros sinais do próximo início da mitose é o surgimento de uma faixa relativamente densa de microtúbulos logo abaixo da membrana citoplasmática. Esta faixa envolve o núcleo num plano que corresponderá ao plano equatorial do fuso acromático mitótico. Esta faixa desaparece após a formação do fuso acromático mas corresponderá ao local onde se forma a separação entre as duas células filhas.

A duração da mitose varia com o tipo de célula, de tecido e de organismo.

As etapas da mitose, propriamente dita, decorrem da seguinte forma:

- Profase - vista ao M.O.C. a transição entre a fase  $G_2$  e a Profase não é nítida. Durante esta etapa, a mais longa de todo o processo mitótico, a cromatina condensa-se gradualmente em cromossomas bem definidos. Durante este processo é visível que cada cromossoma é composto por dois cromátídeos enrolados um no outro, pois o DNA foi duplicado durante a fase S. No final da Profase os cromátídeos estão visíveis lado a lado, unidos pelo centrómero, uma sequência específica de DNA que ligará a molécula às fibras do fuso acromático. A presença do centrómero divide cada cromátídeo em dois braços. É durante esta fase que surge em volta do núcleo a chamada zona clara, que contém os microtúbulos. Estes inicialmente estão orientados ao acaso mas no fim da etapa estão alinhados paralelamente à superfície do núcleo, ao longo do eixo do fuso acromático. O nucléolo desintegra-se e, determinando o final da etapa, o envelope nuclear desaparece;

- Metafase - esta etapa inicia-se com a formação do fuso acromático, uma estrutura tridimensional larga no centro e afilada nas extremidades, que ocupa a área anteriormente ocupada pelo núcleo. As fibras do fuso são feixes de microtúbulos e vão-se ligar a complexos proteicos especializados - cinetócoros - desenvolvidos nos centrómeros durante a Profase. Estes microtúbulos do cinetócoros estendem-se, juntamente com os microtúbulos polares, para os pólos da célula. Através deles vai ocorrer o alinhamento dos cromossomas no centro do fuso, formando a placa equatorial. Nesta situação os cromátídeos estão em posição de se separarem. O alinhamento das fibras do fuso acromático ocorre a partir dos centros de organização dos microtúbulos. Em animais e protistas esse centro organizador é o centrossoma, uma nuvem de material amorfo que rodeia o par de centríolos. Em células

vegetais, que não contêm centrossomas, os organizadores existem e garantem a formação do fuso, mesmo que os pólos sejam pouco definidos;

- Anáfase - esta etapa, muito breve, começa bruscamente, com a separação simultânea de todos os cromatídeos pelos centrómeros. Cada cromatídeo toma agora para si a designação de cromossoma. À medida que os cinetócoros se deslocam em direcção a pólos opostos os braços dos cromossomas são arrastados, sendo as pontas dos braços mais longos as últimas a serem separadas. Este movimento em direcção aos pólos parece dever-se ao encurtamento dos microtúbulos junto ao cinetócoro, como se este "comesse" o caminho ao longo das fibras. No final da Anáfase dois conjuntos idênticos de cromossomas encontram-se em cada pólo;

- Telófase - nesta etapa final da mitose, a separação dos dois conjuntos de cromossomas é finalizada pela formação da membrana nuclear, a partir de retículo endoplasmático rugoso. O fuso acromático desaparece e os cromossomas relaxam novamente, tornando-se indistintos. O nucléolo é reconstituído e cada núcleo entra na interfase.

Tal como referido anteriormente, a citocinese é um processo que se sobrepõe à mitose e corresponde à divisão do citoplasma.

Na maioria das células decorre por invaginação da parede celular, se presente e pela constrição da membrana citoplasmática. No entanto, em células vegetais a separação ocorre através da formação do fragmoplasto.

Esta estrutura é um sistema de fibras semelhantes às do fuso, formadas por microtúbulos mas organizados perpendicularmente ao eixo do fuso. A esta rede de fibras vem juntar-se vesículas do Golgi contendo substâncias pépticas para formar a lamela média. As suas membranas fundem-se para formar a membrana plasmática em formação, do centro para o exterior, em direcção à parede celular já existente. Os plasmodesmos forma-se igualmente neste momento, quando túbulos de retículo endoplasmático liso são apanhados no meio desta rede. Por último, cada célula filha deposita a sua parede celular sobre a lamela média assim formada.

## Meiose

A meiose ocorre apenas em células diplóides especializadas e apenas em ocasiões determinadas do ciclo de vida de um organismo. Através deste fenómeno nuclear, uma única célula diplóide dá origem a quatro células haplóides, designadas gâmetas ou esporos.

Um gâmeta é uma célula que se une a outra semelhante para formar um zigoto diplóide. Pelo contrário, um esporo pode formar um organismo haplóide sem se fundir com outra célula.

A meiose consiste em duas divisões nucleares sucessivas, designadas I e II. Cada uma destas divisões apresenta na sua essência as mesmas etapas que a mitose:

- Profase I - nesta etapa os pares de cromossomas tornam-se visíveis com longos filamentos delgados. Tal como na mitose, já foram duplicados durante a interfase precedente, logo são constituídos por dois cromátídeos unidos pelo centrómero. No entanto, nesta fase, o grau de condensação é tal que parecem estruturas unas. Os cromossomas homólogos emparelham de forma muito precisa, que se inicia em vários pontos e depois progredindo como um zíper que se fecha. Cada homólogo provém de um progenitor diferente. Este emparelhamento - sinapse - é fundamental para a ocorrência de meiose, pelo que este fenómeno não pode ocorrer em células haplóides. Nesta altura os pares de homólogos designam-se bivalentes. Durante a sinapse pedaços de cromátídeos soltam-se e voltam a ligar-se, ao acaso entre os quatro cromátídeos presentes, processo designado crossing-over. Estas trocas podem ser vistas ao microscópio pela formação de figuras em forma de X designadas quiasmas. Ao longo da Profase os quiasmas e sinapses desaparecem, tal como o nucléolo;

- Metafase I - nesta etapa, tal como na mitose, o fuso acromático torna-se visível e os microtúbulos ligam-se aos centrómeros dos cromossomas bivalentes. Estes cromossomas emparelhados deslocam-se, então, para o centro da célula formado a placa equatorial, agora com cada centrómero do par em lados opostos da placa;

- Anafase I - esta etapa inicia-se com a separação dos cromossomas homólogos, que se deslocam para pólos opostos da célula;

- Telofase I - nesta etapa a espiralização dos cromossomas diminui, dando-lhes uma aparência alongada. Novas membranas nucleares são sintetizadas a partir de retículo endoplasmático rugoso enquanto se para gradualmente para a interfase. Finalmente, o fuso acromático desaparece e o nucléolo reorganiza-se. Saliente-se, no entanto, que estes acontecimentos podem não ser tão distintos, passando directamente da Telofase I para a Profase II;

- Profase II - no início da segunda divisão os cromátídeos continuam unidos pelo centrómero, pelo que esta divisão se parece muito com a mitose. Se a membrana nuclear tiver sido refeita na Telofase I irá desaparecer, tal como o nucléolo, e os cromossomas irão condensar novamente;

- Metafase II - forma-se novamente o fuso acromático e os cromossomas alinham-se na placa equatorial;

- Anafase II - os centrómeros dividem-se e afastam-se, levados pelos microtúbulos do fuso acromático, levando os cromossomas simples para cada um dos pólos;

- Telofase II - reorganização da membrana nuclear e nucléolo, com relaxação dos cromossomas, formando núcleos interfásicos.

### Consequências da Meiose :

Durante a meiose o material nuclear foi duplicado uma vez e dividido duas vezes, pelo que cada célula filha apresenta metade do número de cromossomas da célula diplóide inicial. No entanto, mais importante que a redução do número de cromossomas é a consequência genética do processo:

- Na metafase I a orientação ao acaso dos bivalentes causa uma mistura de material materno e paterno pelos dois núcleos filhos;
- Devido ao crossing-over, cada cromossoma contém genes de origem materna e paterna.

Se a célula inicial apresentar dois pares de cromossomas existirão 4 combinações possíveis, se tiver três pares serão 8 e se forem 4 pares de cromossomas, 16 combinações possíveis. A fórmula geral será  $2^n$ , o que na espécie humana corresponde a  $2^{23}$  combinações possíveis, ou seja, 8388608 possibilidades (e existem muitos organismos com número superior de pares de cromossomas!). Acresce ainda o crossing-over para baralhar as coisas e pode-se considerar impossível que uma célula resultante de meiose seja igual à célula que lhe deu origem.

A meiose difere da mitose em três aspectos fundamentais:

- ❖ Consiste em duas divisões sucessivas, originando 4 núcleos;
- ❖ Cada um dos 4 núcleos é haplóide, contendo metade do número de cromossomas da célula-mãe, diplóide;
- ❖ Os núcleos haplóides produzidos contêm combinações genéticas inteiramente novas.

Por este motivo, as consequências genéticas e evolutivas da meiose são profundas. Devido à meiose e à fecundação os organismos diplóides existem numa variedade de formas, mesmo entre os seres da mesma espécie.

## Capítulo IV: Sinalização Celular

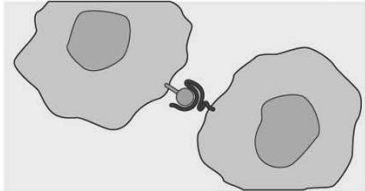


A sinalização celular faz parte de um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as actividades e funções celulares. A habilidade que as células possuem em perceber e correctamente responder ao seu ambiente envolvente, forma a base do desenvolvimento, da reparação de tecidos, da imunidade e de outras funções de homeostasia em tecidos. Erros existentes no processamento de informação celular são responsáveis por doenças como o cancro, a autoimunidade e diabetes. Ao se entenderem melhor os processos de sinalização celular, muitas doenças poderão ser tratadas de maneira mais eficaz e, em teoria, tecidos artificiais poderão ser fabricados.

- Evolução da unicelularidade para a multicelularidade
- Estudos com seres eucarióticos unicelulares: *Saccharomyces cerevisiae*
- Tipos de molécula sinal:
  - proteínas
  - pequenos péptidos
  - aminoácidos
  - nucleótidos
  - esteróis
  - retinóis
  - derivados de ácidos gordos
  - gases dissolvidos

#### Tipos de sinalização

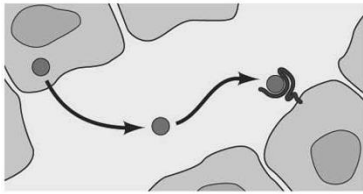
##### a) Contacto directo célula-a-célula



- É necessário que haja grande proximidade física entre as células
- É especialmente importante durante o desenvolvimento e resposta imune

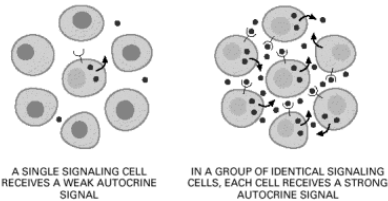
##### b) Sinalização por secreção de moléculas

### b1) sinalização parácrina



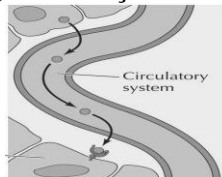
- Moléculas sinal são secretadas e afectam apenas as células mais próximas
- Moléculas sinal não se difundem muito

### b2) sinalização autócrina



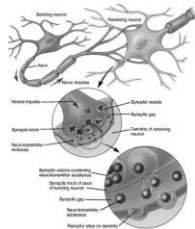
- Uma célula segrega moléculas sinal que se ligam a um receptor da própria célula
- Efeito comunidade

### b3) sinalização endócrina



- Tipo específico de célula secretora: célula endócrina
- Hormonas
- Efeito a longa distância
- Transporte via corrente Sanguínea

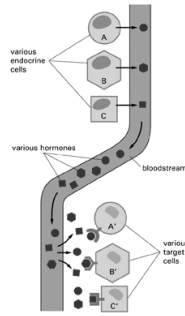
### b4) sinapses químicas



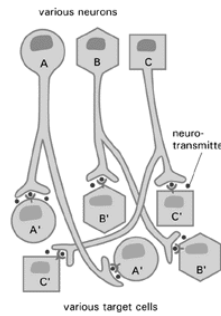
- Neurónios: células especializadas em comunicação
- Prolongamentos longos

Sinalização endócrina Vs sinalização sináptica

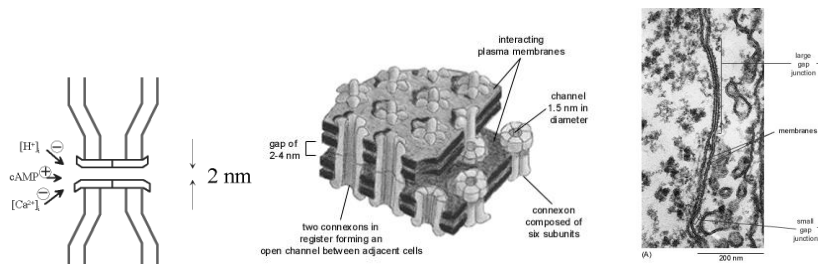
## Sinalização endócrina



## Sinalização sináptica



## Sinalização via gap junctions



## Mecanismos de transdução de sinal

- Receptores ionotrópicos – canais iónicos  
Ex.: canais de  $\text{Na}^+$ , canais de  $\text{K}^+$ , canais de  $\text{Cl}^-$
- Receptores metabotrópicos – ligação de moléculas sinal  
Ex.: péptidos (insulina); catecolaminas (epinefrina)
- A activação das cascatas de sinalização por receptores metabotrópicos pode ser de dois tipos distintos:
  - unidireccionais – quebra irreversível de ligações
  - cíclicas – fosforilação reversível de moléculas

## Benefícios e desvantagens das cascatas cíclicas

- Amplificação de sinal - uma única molécula pode produzir uma resposta muitos milhares de vezes superior ao sinal inicial.
- Integração de numerosos processos biológicos - através da detecção da flutuação da concentração intracelular de vários metabolitos, permitem a integração destes sinais em respostas metabólicas.

- Sensibilidade e Flexibilidade - há um aumento de sensibilidade relativamente a variações de concentração, permitindo modular a activação/desactivação de processos biológicos, bem como modular a sua amplitude.
- Consumo elevado de energia - estas variações constantes aumentam o gasto de ATP a valores acima da taxa de turn-over de ATP das células (1-10 mmol/L/min).

#### Tipos de receptores celulares

##### Receptores ligados a enzimas:

- Receptores TGF $\beta$
- Receptores de citosina
- Receptores tirosino-quinase
- Receptores de célula T
- Receptores guanilil -ciclases

##### Receptores iónicos:

- Canais iónicos, controlados por ligantes: neurotransmissores, cGMP

##### Receptores ligados a Proteínas G Triméricas:

Ligantes: epinefrina, glucagon, serotonina, vasopresina, ACTH, adenosina

Receptores: sete hélices  $\alpha$  transmembranares

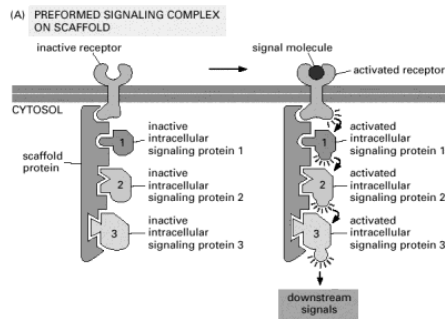
#### Papel dos receptores transmembranares na transdução de sinal

##### Receptores transmembranares possuem estrutura conservada:

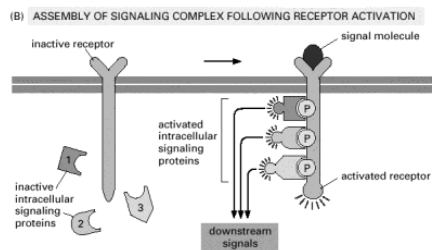
- 7 hélices hidrofóbicas que atravessam a membrana celular.
- Terminal N contendo unidades de oligossacarídeos
- Terminal C contendo serinas e treoninas que podem sofrer fosforilação.
- Ligação do mensageiro primário a uma bolsa formada pelos domínios transmembranares.

#### Transdução de Sinal:

As proteínas de sinalização encontram-se previamente ligadas ao receptor



As proteínas de sinalização apenas se ligam ao receptor quando este é activado



Os níveis dos segundos mensageiros como o  $CA^{2+}$ , o cAMP e o  $IP_3$ , são aumentados ou ocasionalmente, reduzidos em resposta à ligação de ligantes aos receptores de superfície celular. Essas moléculas não proteicas de sinalização intracelular, por sua vez regulam a actividade das enzimas e das proteínas não enzimáticas.

Entre as proteínas conservadas que actuam na diversas vias de transdução do sinal encontram-se as proteínas G monoméricas (que são pequenas) e triméricas (grandes) que são duas classes de proteínas comutadoras GTPase e as Proteína-quinases e fosfatases – em que qualquer activação do receptor de superfície celular leva directamente ou indirectamente a alterações na fosforilação das proteínas pela sua activação.

As proteína-quinases têm 2 tipos: as que accionam fosfato ao agrupamento hidroxil em resíduos tirosina e as que adicionam fosfato ao agrupamento hidroxil em resíduos serina e/ou treosina.

As fosfatases, que removem agrupamentos de fosfato, podem actuar em concreto com as quinases para modular o funcionamento de várias proteínas, ligando-as ou desligando-as. De acordo com os últimos dados, o genoma humano codifica 500 proteína-quinases e 100 diferentes fosfatases. Em algumas vias de sinalização, o próprio receptor apresenta actividade quinase ou fosfatase intrínseca; em outras vias o receptor interage com quinases citosólicas ou associadas à membrana.

Em geral, cada proteína-quinase fosforila resíduos específicos em conjunto de proteínas-alvo cujos padrões de expressão são geralmente diferentes de acordo com o tipo celular. Várias proteínas são substratos de múltiplas quinases, e cada evento de fosforilação sobre um aminoácido diferente modifica a actividade de uma determinada proteína alvo de diferentes formas, algumas vezes activando o funcionamento, outras o inibindo.

As proteínas citosólicas que contêm múltiplos domínios PDZ desempenham um papel fundamental na organização da membrana plasmática da célula pós-sináptica. O domínio PDZ foi identificado como um elemento comum a várias proteínas citosólicas que se ligam a proteínas integrais de membrana. Esse domínio é relativamente pequeno, contendo aproximadamente 90 resíduos de aminoácidos e se liga a sequência de 3 resíduos presentes na extremidade C terminal das proteínas-alvo.

A maioria dos receptores de superfície celular e dos transportadores contém múltiplas subunidades, cada uma das quais pode se ligar a um domínio PDZ. Da mesma forma, muitas proteínas citosólicas contêm tanto, domínios PDZ múltiplos como outros tipos de domínios que participam das interações proteína-proteína e, assim, podem ligar a múltiplas proteínas da membrana ao mesmo tempo. Essas interações permitem que ocorra o agrupamento de diversas proteínas de membranas de grandes complexos. Outras interações proteína-proteína permitem que esses complexos se liguem aos filamentos de actina que revestem a superfície interna da membrana plasmática. Visto que um único filamento de actina pode ligar vários grupos.

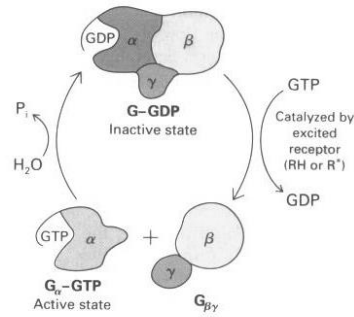
Diversos receptores de proteínas de transdução de sinal agrupam em plataformas de lipídios que contêm caveolina, uma família de proteínas de aproximadamente 25kDa. As proteínas caveolina possuem um segmento hidrofóbico central que, pode atravessar a membrana duas vezes posicionando-se em ambas as extremidades N e C terminal da proteína direccionadas para o citosol. Tais agrupamentos podem facilitar as interações entre as proteínas sinalizadas, elevando assim transdução de sinal.

A rápida interrupção da sinalização quando o ligante em particular é retirado e a dessensibilização do receptor sob altas concentrações de ligante ou após a exposição prolongada ao ligante auxiliam as células a responderem adequadamente quando submetidas a diferentes circunstâncias.

## Proteína G

- Proteína G

- Constituída por 3 subunidades:  $\alpha$  (45kD),  $\beta$  (35kD) e  $\gamma$  (7kD).
- Alterna entre uma forma que liga GTP (Activa) e uma forma que liga GDP (Inactiva).
- Ligação da hormona ao receptor altera a conformação da proteína G para a forma activa.
- A activação da proteína passa pela abertura do local de ligação de GTP na proteína G.

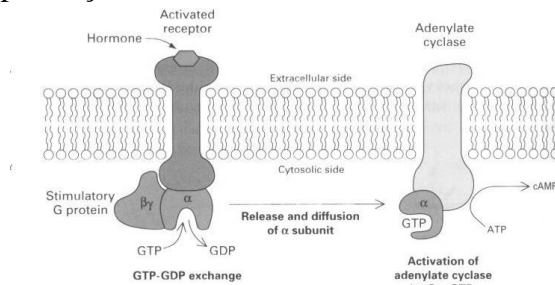


Vários processos fisiológicos são controlados por proteínas G.

Estímulo	Receptor	Prot. G	Efector	Resp. Fisiol.
Epinefrina	receptor b-adren.	Gs	Adenil. Cicl.	Degradação glicog.
Serotonina	receptor seroton.	Gs	Adenil. Cicl.	Melhoria sensorial
Acetilcolina	receptor muscar.	Gi	Canal K <sup>-</sup>	↓ activ. pacemaker
Odorantes	receptor olfact.	Golf.	Adenil. Cicl.	Olfacto

Proteína G como activadora da adenilato ciclase

- Sub-unidade Gsa – GTP migra em direcção à adenilato ciclase, levando à produção de AMPc.
- Formação de várias sub-unidades de Gsa – GTP por cada hormona ligada – Amplificação de sinal



As proteínas G triméricas traduzem os sinais de receptores de superfície celular acoplados para as proteínas efectivas associadas, as quais são enzimas que formam segundos mensageiros ou proteínas de canais de catiões.

Os sinais mais comuns são traduzidos por Gα, uma proteína comutadora GTPase que altera entre um estado activo com GTP associado e um estado inactivo, com o GDP. As subunidades β e γ, que permanecem ligadas entre elas, ocasionalmente traduzem o sinal.

Os receptores ocupados por hormonas actuam como GEFs para proteínas  $G_{\alpha}$ , catalisando a dissociação do GDP e permitindo a ligação do GTP. A alteração resultante na conformação das regiões comutadoras de  $G_{\alpha}$  provoca sua dissociação da subunidade  $G_{\beta\gamma}$  e a interacção com uma proteína efectiva.

A  $G_{sa}$ , que é activada por diferentes tipos de GPCRs, se liga á adenil-ciclase, activando-as, aumentando a síntese de 3'-5'- AMP cíclico (cAMP).

A activação dependente de cAMP de proteíno-quinase A (PKA) medeia os diversos efeitos de cAMP nas diferentes células. Os substratos para PKA e, consequentemente, a resposta celular à activação de PKA induzida por hormona variam entre os diferentes tipos de celulares.

No fígado e nas células musculares, a activação de PKA induzida pela epinefrina e por outras hormonas exerce o efeito duplo, inibindo a síntese de glicogénio e estimulando a sua quebra através de uma cascata de quinases.

As vias de sinalização que envolvem segundos mensageiros e cascatas de quinases amplificam grandemente os sinais externos.

Qos BARK fosforili-sa receptores  $\beta$ -adrenérgicos com ligantes associados, levando à ligação de  $\beta$ -arrestina e à endocitose dos receptores. A consequente redução no número dos receptores de superfície celular torna a célula menos sensível a maiores concentrações de hormona.

O posicionamento da PKA em regiões específicas da célula pelas proteínas de ancoramento restringe os efeitos de cAMP a regiões subcelulares determinada.

#### Proteína G como activadora da canais iónicos

O receptor muscarínico de acetilcolina é um GPCR cuja proteína efectora é um canal de  $K^{+}$ . a activação do receptor provoca a libertação da subunidade  $G_{\beta\gamma}$  que abre os canais de  $K^{+}$ . a resultante hiperpolarização da membrana celular diminui a frequência de contração da musculatura cardíaca.

A Rodopsina e GPCR fotossensível dos bastonetes é composta pela proteína opsina ligada a 11-cis-retinal. A isopsina activada que, então activa a proteína G trimérica associada, a transducina ( $G_t$ ), por meio de catálise de troca de GTP livre pelo GDP ligado, na subunidade  $G_{ta}$ . GTP é a cGMP-fosfodiesterase. A redução a nível do cCMP mediada por essa enzima leva ao fechamento dos canais de  $Na^{+}/Ca^{2+}$  controlados por cGMP e à diminuição da libertação de neurotransmissor.

Como acontece com outras proteínas  $G_{\alpha}$ , a ligação do GTP rompe as interacções moleculares com a  $G_{\beta\gamma}$  e permite que a  $G_{ta}$ .GTP se ligue a seu efectivo junto.



A fosforilação de osina, activada por luminosidade e mediada pela rodopino-quinase, assim com a consequente ligação de arrestina à opsina fosforilada, inibe a sua capacidade de activação de transducina. Esse mecanismo geral de adaptação ou dessensibilização é utilizado por outros GPCRs quando os níveis dos seus ligantes estão elevados.

#### Proteína G como activadora das Fosfolipase C

A estimulação de alguns GPCRs ou de outros receptores de superfície celular leva á activação da fosfolipase C, a qual gera depois segmentos mensageiros: o  $\text{IP}_3$  difusível e o DAG ligado á membrana.

O  $\text{IP}_3$  induz a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  controlados por  $\text{IP}_3$  no retículo endoplasmático e a elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico livre. Em resposta ao elevado  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, a proteína-quinase C é recrutada para a membrana plasmática onde é activada pelo DAG.

O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina regula a actividade de várias proteínas diferentes inclusive a cAMP-fosfodiesterase, a óxido nítrico-sintase e as proteína-quinases ou fosfatase que controlam a actividade de vários factores de transcrição.

A estimulação de GPCR de acetilcolina das células endoteliais induz uma elevação no  $\text{Ca}^{2+}$  cotosólico e a subsequente síntese de NO. Após a sua difusão para as células musculares lisas adjacentes, o NO activa a guanilil-ciclase intracelular e a síntese de cGMP.

A síntese de cGMP nas células da musculatura vascular lisa leva ao relaxamento muscular e á vasodilatação.

#### Proteína G como activadora na transcrição de Genes

A activação da fosfolipase C por receptores acoplados à proteína  $G_o$  ou  $G_q$  deixa o factor de transcrição Tubby, que está ligado à  $\text{PIP}_2$ , inserido na membrana plasmática das células em repouso.

A activação de proteína-quinase A (PKA) induzida por sinalização frequentemente leva à fosforilação da proteína CREB que em conjunto com o co-activador GBP/300, estimula a transcrição de diversos genes-alvo.

O complexo GPCR-arrestina activa várias quinases citosólicas iniciando cascatas que levam á activação transcricional de vários genes que controlam o crescimento celular.